

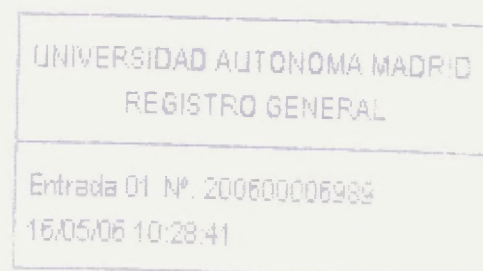
Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de Madrid

"CARACTERIZACION MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LOS GENES CODIFICANTES PARA PBP4B, MRAZ Y MRAW INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE BIOSINTESIS DEL PEPTIDOGLICANO Y DIVISION CELULAR DE *Escherichia coli* Y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium"

Memoria presentada por **Daniel Edgar Vega Mendoza** para optar el grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección del Dr. Juan A. Ayala Serrano.

Madrid 2006

Reg. #C. 41.766



Molecular and functional characterization of the genes coding for PBP4B, MraZ and MraW involved in the bacterial cell division and peptidoglycan biosynthesis of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

A reasonable alternative to the present problem of antimicrobial resistance phenomenon that present the pathogen bacteria, is the researching and design of new antimicrobial compounds focusing highly specific, selective and essential bacterial target that not present deleterious effects on the human been.

Bacterial cell division and peptidoglycan biosynthesis are processes that show an exclusive and essential bacterial character with highly possibilities to be used like an antimicrobial target. In the biosynthetically pathways of peptidoglycan (PG) are involved 3 different compartments: cytoplasm, cytoplasmatic membrane and periplasm. The last phase of the PG biosynthesis is carried out by Penicillin-Binding Proteins (PBP), enzymes responsible of the elongation and maturation of the PG in the periplasm through DD-carboxypeptidase, DD-endopeptidase, transpeptidase, transglycosidase and β -lactamic activities.

By in silico analysis our working group discovered a new putative PBP that due the sequence homology with PBP4 was called PBP4B. By this reason one of the main objectives is get the cloning, expression and purification of PBP4B in order to perform enzymatic assays to determine its biological function.

At the cytoplasmatic level, the generation of soluble precursors for PG biosynthesis and bacterial cell division, involve a several genes grouped in the *dcw* cluster under the control of the P_{mra} promoter with *mraZ* and *mraW* genes present at the beginning of this cluster. *mraW* are highly conserved but its biological function is unknown. In order to determine the role in the bacterial processes the cloning, expression and purification of MraW was made.

The genes codifying for PBP4B, MraZ and MraW were inactivated in SL1344 by a simple technique based in homologous recombination. The results were a series of viable mutants, demonstrating the not essential character of these genes in the capacity of infection and intracellular proliferation when were tested in eukaryotic cell lines and mouse model.

Several kinds of assays were made in PBP4B, demonstrating that it is a PBP with very low DD-carboxypeptidase activity. In the case of MraW, it presents an S-Adenosyl-Methyl transferase activity.

Quiero en primer lugar dar gracias al Dr. Juan A. Ayala Serrano, quien ha sido durante este periodo tan especial de mi vida profesional, más que un maestro, un amigo. Gracias por saber trascender lo profesional y basar nuestra relación en un mutuo respeto.

Agradecer también al Dr. José Berenguer Carlos, por su atención, apoyo y especialmente por su confianza en mi trabajo.

Gracias, al Dr. Miguel Angel de Pedro Montalban, por su acertada ayuda y consejos durante el desarrollo de mi tesis.

Agradecer a todos aquellos que han sabido enseñarme día a día, brindándome sus conocimientos y enriqueciendo mi vida profesional y personal. No soy partidario de detallar nombres, pues se que la memoria es frágil y temo olvidar a alguien, pero no puedo dejar de intentarlo, gracias a Felipe, Federico, Ana, Rodrigo, Eloy, Said, Zahra, Elisa, Juan Alcain, Renata, Olga, Guillermo, Miguel Serrano,

Gracias a David y Alonso por una amistad que nunca olvidare

Gracias a toda mi familia, por soportar mi ausencia y animarme en esta tarea, a ellos dedico este logro.

Gracias a todos

INDICE

1. IL SISTEMA DI GESTIONE INTEGRATA (SGI) E IL MODELLO DI GESTIONE INTEGRATA (MGI) 1

Introducción		pag. 01
Objetivos		pag. 16
Materiales y métodos		pag. 18
1. Material biológico		
1.1	Estirpes bacterianas	pag. 18
1.2	Bacteriófago	pag. 18
1.3	Líneas celulares eucariotas	pag. 19
1.4	Animales de experimentación	pag. 19
1.5	Plasmidos	pag. 19
1.6	Cebadores	pag. 19
1.7	Anticuerpos	pag. 21
2. Sustitución e inactivación genética en <i>E. coli</i> y SL1344		pag. 22
3. Medios y condiciones de cultivo		pag. 24
3.1	Medios de cultivo para el crecimiento de <i>E. coli</i> y SL1344	pag. 24
3.2	Condiciones de crecimiento bacteriano	pag. 24
3.3	Medios de cultivo y condiciones de crecimiento de líneas celulares	pag. 24
4. Ensayos de infección in vitro en células HeLa, NIH/3T3 y NRK por SL1344		pag. 25
4.1	Preparación de placas p24 para los ensayos de infección	pag. 25
4.2	Preparación del inóculo de infección	pag. 25
4.3	Ensayo de infección	pag. 25
4.4	Control y recuento de los puntos de control post infección	pag. 26
4.5	Valoración de la capacidad de invasión	pag. 26
4.6	Valoración del índice de proliferación intracelular	pag. 26
5. Ensayos de infección en modelo en ratón.		pag. 27
5.1	Preparación de las muestras para inocular por vía oral	pag. 27
5.2	Recuento post-infección en hígado y bazo	pag. 28
5.3	Análisis de la expresión genética por RT-PCR	pag. 29
6. Microscopia confocal y de fluorescencia		pag. 29
7. Microscopia in vivo en campo claro		pag. 30
8. Clonaje, expresión, purificación y determinación de actividad enzimática de PBP4B de <i>E. coli</i> y <i>mraW</i> de <i>Lactococcus lactis</i> MG-8 y SL1344.		pag. 31
8.1	Amplificación por PCR	pag. 31
8.2	Obtención de los genes <i>mraW</i> y <i>pbp4b</i> con extremos cohesivos	pag. 31
8.3	Construcción del vector pET28 conteniendo <i>mraW</i> y <i>pbp4b</i>	pag. 31
8.4	Expresión y purificación de <i>MraW</i> y <i>PBP4B</i>	pag. 31
8.5	Cross-linking con U.V y unión de S-adenosil-L-metionina de <i>MraW</i>	pag. 32
8.6	Ensayo de la actividad metil transferasa de <i>MraW</i>	pag. 33

8.7	Determinación de actividad DD-carboxipeptidasa en PBP4B usando como sustrato el disacárido-pentapéptido	pag. 33
8.8	Determinación de actividad DD-carboxipeptidasa en PBP4B usando como sustrato el tripéptido N α , N ϵ -Diacetyl-Lys-D-ala-D-ala	pag. 33
8.9	Ensayos de unión a Bocillin-FI en PBPB	pag. 34
8.10	Extracción del peptidoglicano (PG)	pag. 34
8.11	Análisis por H.P.L.C de la composición en muropeptidos del PG	pag. 35
9.	Clonaje de PBP4B y AmpC en PK18 y transformación en CS-109, CS-802-2 y DV-900 para determinar actividad β-lactamasa usando Nitrocefín.	pag. 36
10.	Sustitución y eliminación de <i>mraW</i> en SL1344/pBAD33-<i>mraW</i>	pag. 37
11.	Análisis del efecto de la sobreexpresión de MurF	pag. 38
12.	Sustitución y eliminación del gen <i>gidB</i>	pag. 38
Resultados		
1.	Sustitución e inactivación genética en <i>E. coli</i> y SL1344 del gen codificante para PBP4B.	pag. 40
2.	Análisis de los mutantes derivados de la sustitución e inactivación de <i>pbp4b</i> en SL1344	pag. 44
3.	Sustitución y eliminación del gen <i>pbp4b</i> en el mutante CS-802-2	pag. 47
4.	Caracterización de DV-900	pag. 48
5.	Clonaje, expresión, purificación y determinación de la actividad enzimática de PBP4B.	pag. 51
6.	Análisis del efecto de la sobre expresión de MurF en la biosíntesis del PG	pag. 57
7.	Sustitución e inactivación genética en SL1344 de los genes <i>mraZ</i> y <i>mraW</i>	pag. 63
8.	Caracterización de los mutantes generados del reemplazo y eliminación de <i>mraZW</i>.	pag. 65
9.	Ensayo de infección en células HeLa, NIH/3T3 y NRK por SL1344.	pag. 66
10.	Cuantificación de la expresión de los genes del cluster <i>dcw</i>.	pag. 70
11.	Análisis por HPLC del peptidoglicano.	pag. 73
12.	Clonaje, expresión, purificación y determinación de la actividad enzimática de <i>MraW</i>	pag. 74
13.	Sustitución y eliminación de <i>gidB</i>	pag. 76
14.	Sustitución y eliminación de <i>mraW</i> en SL1344/pBAD33-<i>mraW</i>.	pag. 80

Discusión	pag. 83
Conclusiones	pag. 91
Bibliografía	pag. 92

INTRODUCCIÓN

El presente documento tiene como objetivo principal proporcionar una visión general de los conceptos y principios fundamentales que rigen el desarrollo de los sistemas de información. A lo largo de este texto, se abordarán temas como la planificación, el análisis de requisitos, el diseño, la implementación y el mantenimiento de estos sistemas, así como también se explorarán algunas de las herramientas y metodologías más utilizadas en el campo.

Actualmente es preocupante la increíble versatilidad y adaptabilidad de los microorganismos patógenos, así como la complejidad y variedad de los mecanismos de resistencia a los antibióticos actualmente en uso, inclusive a los de última generación, lo cual ocasiona un grave problema de salud a nivel mundial especialmente en países en vías de desarrollo, con el resurgimiento de enfermedades infecciosas que hasta hace algunos años se consideraban prácticamente erradicadas. ⁽⁴⁰⁾⁽⁷⁹⁾

Una alternativa a esta problemática, es el diseño de nuevos antimicrobianos que enfoquen dianas altamente específicas, selectivas y esenciales para la supervivencia del organismo patógeno, que no afecten al ser humano, tratando de evitar la adquisición de resistencia. ⁽⁶¹⁾⁽⁴¹⁾ El enfoque tomado en este trabajo de investigación involucra los procesos de división celular y biosíntesis del peptidoglicano (PG) en bacterias, así mismo centra su interés en las β -lactamasas, debido al papel clave en relación con las Penicillin-Binding Proteins (PBPs) y los procesos en que estas participan. ⁽¹⁾⁽³⁸⁾⁽⁸⁴⁾

Quizás el aspecto mas importante desde el punto de vista práctico de esta investigación, deriva del enfoque, como posibles dianas antibacterianas de los componentes involucrados en la biosíntesis del PG, el cual al presentar un carácter exclusivamente bacteriano y la elevada especificidad de su ruta biosintética, constituida por una serie de etapas que bien en razón de los sustratos implicados, bien en razón de la naturaleza de la reacción, no tienen contrapartida en otros grupos de organismos. Estas propiedades, junto con el carácter estrictamente esencial de la síntesis de la capa de PG, hacen de este un proceso con una enorme potencialidad como sitio de acción de agentes antibacterianos. ⁽²⁾

De acuerdo con lo anteriormente indicado, debe ser posible identificar o diseñar, inhibidores específicos de algunas de las reacciones implicadas en la ruta biosintética del PG, que debido al carácter exclusivamente bacteriano de aquella, carezcan de efectos deletéreos sobre otros organismos, en particular sobre el ser humano. La posible utilidad de los compuestos diseñados contra las dianas específicas que se puedan descubrir, como agentes quimioterapéuticos es inmediata. De hecho, algunos de los antibióticos de mayor aplicación clínica en la actualidad (β -lactámicos, fosfomicina, vancomicina, etc.) actúan precisamente a este nivel. En consecuencia, cabe esperar que de un más detallado conocimiento del metabolismo del PG, surjan nuevas posibilidades para el diseño de agentes antibacterianos que mejoren o complementen a los actuales. ⁽²⁾

Los antibióticos β -lactámicos son inhibidores específicos de las PBPs, ⁽⁴⁸⁾⁽⁷¹⁾ que son las enzimas que catalizan las últimas fases de la síntesis del PG, estructura responsable de la preservación de la integridad celular, resistencia frente a la presión osmótica interna ejercida por el citoplasma y mantenimiento de la forma celular, convirtiéndolo todo estos factores en un blanco factible para el diseño de nuevas dianas antibacterianas específicas. ⁽²⁾⁽⁸¹⁾⁽⁷²⁾

En la ruta biosintética del PG están involucrados tres compartimentos celulares: el citoplasma, la membrana citoplasmática y el periplasma. La biosíntesis comienza con el derivado activado del N-Acetil-Murámico (UDP-NAcMur) al cual se añaden de manera secuencial y con el aporte de energía vía hidrólisis del ATP, los aminoácidos: L-alanina (L-Ala), D-glutámico (D-Glu), meso-diaminopimelico (m-DAP) y el dímero D-Ala-D-Ala por las ligasas citoplasmáticas MurC, MurD, MurE y MurF respectivamente, dando lugar al precursor soluble UDP-NacMur-pentapéptido. El dipéptido D-Ala-D-Ala se forma mediante dos etapas sucesivas, en la primera el producto del gen *alr*, la racemasa, convierte la forma L en D (configuración muy poco común en la naturaleza) y, seguidamente la acción de dos ligasas, productos de los genes *ddlA* y *ddlB*, sintetizan el dipéptido. ⁽⁵⁸⁾

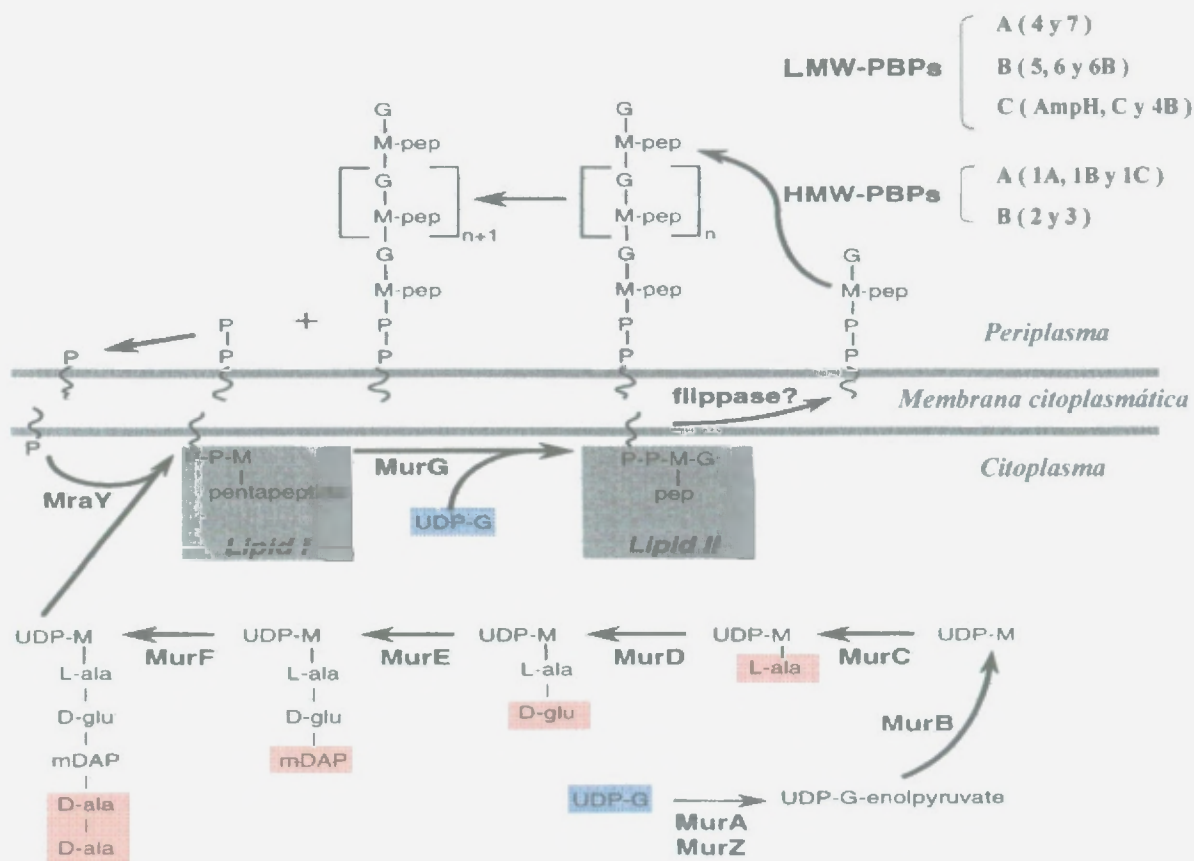


Figura N° 01. Esquema general de la ruta biosintética del PG.

Se aprecia la ubicación en cada uno de los compartimentos celulares de las enzimas implicadas. HMW PBPs, High Molecular Weight Penicillin-Binding Proteins cuyos grupos A (1A, 1B y 1C) presentan actividad transpeptidasa (Tpasa) y transglucosilasa (TGasa) y B (2 y 3) TPasa. LMW PBPs, corresponde a Low Molecular Weight Penicillin-Binding Proteins, donde los grupos A (4 y 7) presentan actividad DD-endopeptidasa (DD-Epasa), B (5, 6 y 6B) carboxipeptidasa (CPasa) y C (AmpH, AmpC y en rojo, PBP4B, enzima que centrara nuestra atención en el transcurso del trabajo de investigación) β-lactamasa (β-Lasa) y/o CPasa.

Previo al ensamblaje del UDP-NacMur-Pentapéptido (o UDP-NacMur-Tripéptido) en el PG preexistente, este debe atravesar la membrana citoplasmática altamente hidrofóbica, transfiriéndose para ello a un lípido transportador, el C55-Isoprenil-fosfato (undecaprenil fosfato o bactoprenol) por acción de MraY o Translocasa I, generándose el lípido I (Undecaprenil-P-P-UDP-NacMur-Pentapéptido) al cual se añade la N-acetil-glucosamina por acción de MurG, generándose el lípido II en el citoplasma, donde mediado por FtsW / RodA, ocurrirá la polimerización de los precursores a través de las PBPs 1A, 1B, 2 y 3 catalizando actividades de transglicosilación (polimerización de las cadenas nacientes vía formación de un enlace glucosídico β 1-4 entre el C₁ del NAcMur y el C₄ de NAcGlc) y/o D-D transpeptidación (entrecruzamientos de las cadenas por hidrólisis de un enlace D-Ala-D-Ala de una cadena pentapéptica (donadora) y la formación de un enlace peptídico entre la penúltima D-Ala y el mDAP de otra unidad peptídica (aceptora)) (ver figura N° 01 y 02).⁽³⁴⁾⁽³⁶⁾⁽⁵⁴⁾⁽⁷⁷⁾

El número de muropéptidos que se unen para formar las cadenas glicosídicas lineales es variable. La longitud de las cadenas es estimable en función de la proporción de muropéptidos con residuos de ácido β (1-6) anhidro N-acetil murámico que solo aparecen en posición terminal de las cadenas glicosídicas. La longitud media de las cadenas es de unos 35 muropéptidos, aunque la distribución presenta un valor modal de aproximadamente 10 a 12 disacáridos por cadena. La cadena peptídica del muropéptido puede tener entre 2 y 5 aminoácidos, siendo los muropéptidos con cadenas tetrapépticas las más abundantes (alrededor del 70 % del total). La D-ala terminal de la cadena se encuentra sustituida por glicina en una fracción considerable de muropéptidos en dependencia de la abundancia de glicina en el medio.⁽²⁷⁾

Las cadenas peptídicas contiguas se entrecruzan entre sí a través de 2 tipos de uniones de configuración estereoquímica diferente: I) Uniones peptídicas de configuración D-D entre el grupo carboxilo de la D-ala en posición 4 de la cadena peptídica de un muropéptido y el grupo D-amino del residuo de m-DAP de un muropéptido adyacente (puentes D-ala-D-meso dap), II) puentes peptídicos L-D entre el grupo carboxilo del centro L del residuo de diaminopimélico de un muropéptido y el grupo amino del centro D del m-DAP de un segundo muropéptido en una cadena glicosídica próxima (puentes L-meso dap-D-meso dap, abreviadamente dap-dap). (Figura N°02)

La proporción de cadenas peptídicas que participan en la formación de puentes determina el grado de entrecruzamiento de la mureína. Una mureína con un índice elevado de entrecruzamiento se presenta físicamente como una malla más compacta y en principio con más resistencia mecánica. El índice de entrecruzamiento oscila entre el 30 y 50 %, dependiendo del estado de crecimiento de la célula. Los puentes peptídicos dap-dap pueden llegar a representar el 20% del total de puentes peptídicos.⁽⁶⁰⁾

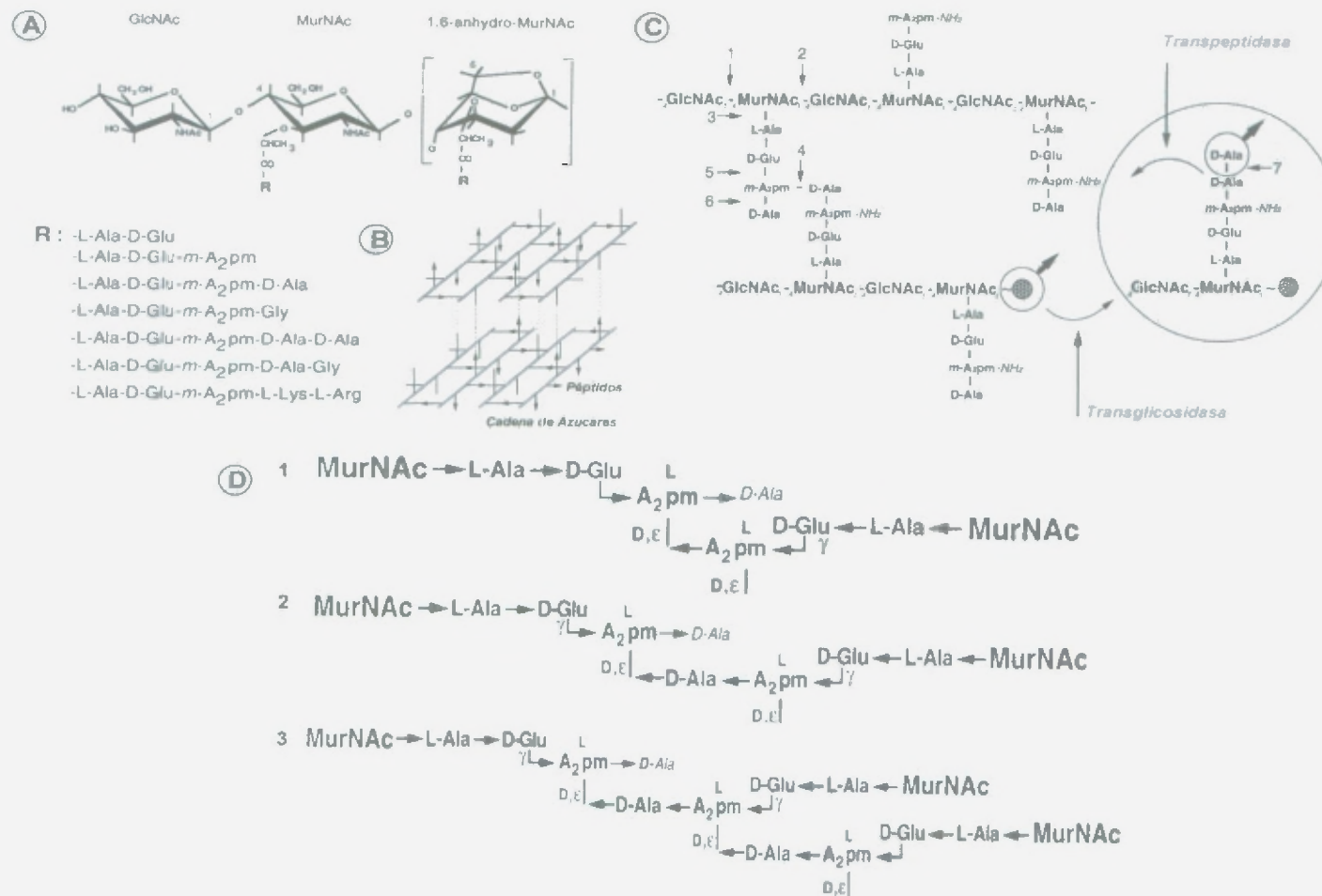


Figura N° 02. Estructura y composición de la mureína de *E. coli*.

(A) Estructura de mureopéptidos monoméricos identificados a partir de mureína de *E. coli*. Se muestran los diferentes grupos de péptidos (R) que pueden sustituir el grupo lactil de MurNAc. (D) Principales entrecruzamientos: (1) dímeros D,D-(Ala-A₂pm), (2) dímeros D,L-A₂pm-A₂pm y (3) trímeros D,D-(Ala-A₂pm). A₂pm: Ácido Diaminopimelico. (B) Arquitectura de la capa de mureína. Las líneas punteadas muestran como las dos capas idénticas se unen formando una multicapa. — representan los azúcares, los enlaces peptídicos (aceptores de péptidos) por — y las → (donador de péptidos). (C) se muestra una sección de mureína de *E. coli*. El círculo punteado muestra como un nuevo precursor de mureína unido a un grupo undecaprenil pirofosfato es unido a la mureína existente por formación de dos enlaces. Concomitante con la ruptura del enlace peptídico D,D entre los dos residuos D-Ala del precursor pentapéptido, una transpeptidasa forma un enlace peptídico D,D entre el grupo carboxil de la penúltima D-Ala del precursor y el grupo amino epsilon de un residuo de A₂pm presente en el grupo peptídico de la mureína en crecimiento. Una transglicosidasa rompe el enlace pirofosfato entre el grupo undecaprenil y el MurNAc de una cadena de azúcar naciente en el sáculo y forma un enlace glicosídico al grupo hidroxil al C4 del GlcNAc de la molécula precursora. Los números señalan los enlaces rotos por hidrolasas específicas de mureína presentes en *E. coli*: 1. N-acetilglucosaminidasa; 2. transglicosidasa lítica; 3. N-acetilmuramyl-L-alanina amidasa; 4. D,D-endopeptidasa; 5. γ-D-glutamyl-L-A₂pm endopeptidasa; 6. L,D-carboxipeptidasa y 7. D,D-carboxipeptidasa.

La membrana externa y el sáculo se encuentran unidos por medio de la lipoproteína de Braun (LPP), específica de la membrana externa, muy abundante (10^5 copias por célula) y de 7,5 KDa, caracterizada por tener el residuo de cisteína N-terminal acilado en el grupo amino por un ácido graso y en el grupo -SH por un diglicérido mediante la formación de un enlace tioéter. La LPP coexiste en dos formas: libre y unida covalentemente a la mureína en una proporción de 2:1 aproximadamente.⁽⁹⁾

La unión de la LPP a la mureína se realiza a través de un enlace peptídico entre el grupo ϵ -amino de la lisina C-terminal de la lipoproteína y el grupo carboxilo del centro L del residuo de diaminopimélico de un muropéptido, que en este caso sería el terminal de la cadena peptídica del muropéptido. En promedio un 10% de los muropéptidos están unidos a la lipoproteína. La unión covalente por el extremo C-terminal al sáculo y la interacción de los ácidos grasos en el extremo N-terminal con los lípidos de la membrana externa constituye un eficaz sistema de unión de ésta con el sáculo.⁽⁹⁾

La introducción de nuevos métodos para el análisis de la mureína mediante HPLC, ha supuesto un enorme avance en el estudio de la estructura y síntesis de este componente. Mediante este método se han identificado mas de 30 muropéptidos diferentes (ver figura N° 03) en el sáculo de *Escherichia coli* (*E. coli*), el conocimiento a un nivel más profundo de la composición y modo de inserción de esta macromolécula permite comprender mejor su papel en los procesos de la división y elongación bacteriana.⁽¹⁷⁾

De la misma manera, interesa saber los cambios que ocurren en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (SL1344) a nivel de la estructura del PG cuando se halla en el ambiente intracelular in vivo e in vitro, ya que estudios realizados muestran que el PG de SL1344 proliferando en el interior de células epiteliales humanas contienen una elevada proporción de muropéptidos no identificados previamente (5-10 veces mas que en bacterias extracelulares).⁽⁶³⁾ Por nuestra parte se realizaran la extracción y análisis por HPLC de los muropéptidos de los mutantes que se generen tanto en *E. coli* como en SL1344.

Los muropéptidos se pueden agrupar en familias relacionadas estructuralmente y en principio funcionalmente, en base a: i) el numero de unidades disacarídicas que los forman (monómero, dímero, trímeros y tetrámeros, aunque estos son muy minoritarios); ii) el tipo de puente que une las cadenas peptídicas (dap-D-ala, o dap-dap); iii) unión covalente a lipoproteína; iv) la presencia de residuos de ácido β (1-6) anhidro N-acetil murámico.⁽⁶⁰⁾

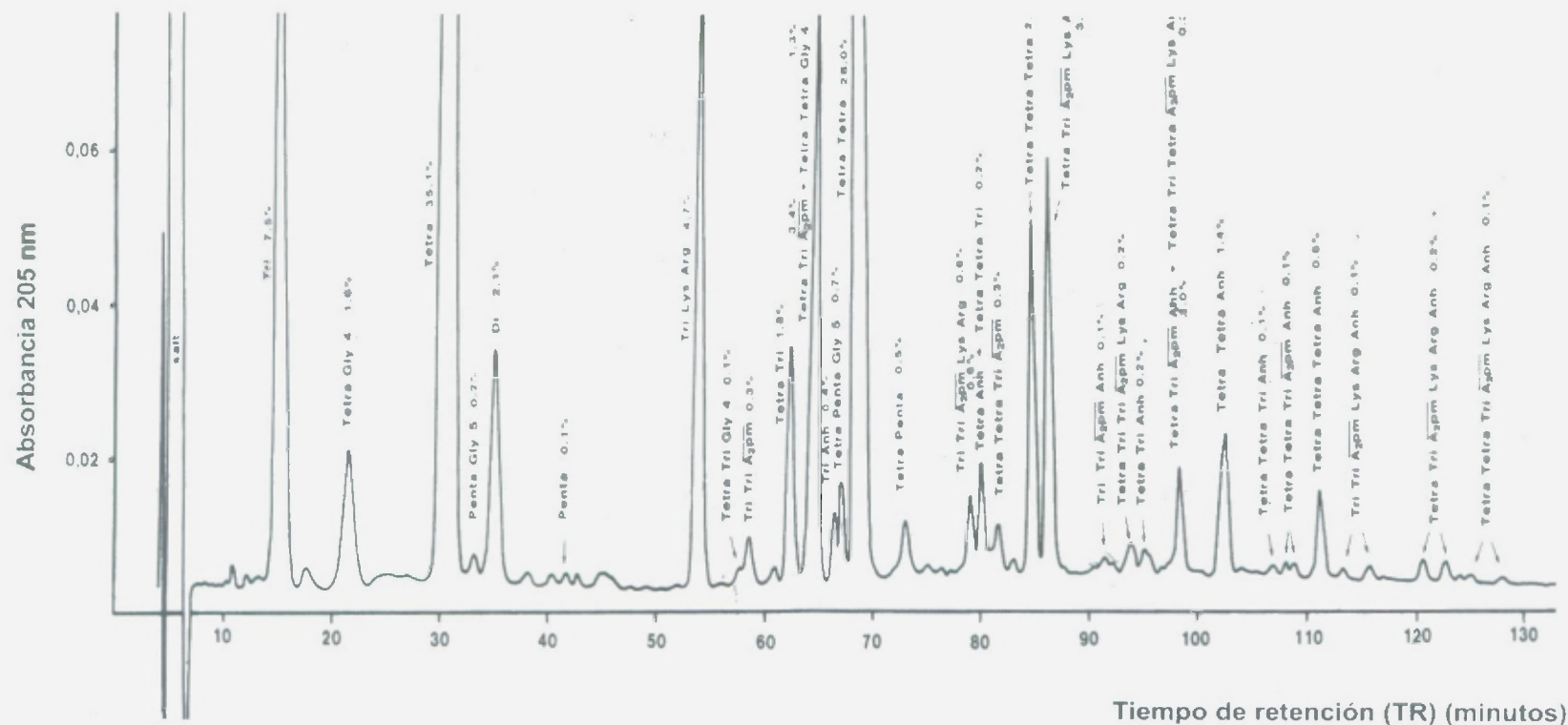


Figura N° 03. Separación de los muropeptidos de *E. coli* KN126 por HPLC

Muropeptidos de una muestra de sáculos de *E. coli* KN 126, la composición de los compuestos fue determinada por hidrólisis enzimática parcial y análisis de aminoácidos y cuantificados a 205 nm por HPLC. Se designan los compuestos como; Di: GlcNac-MurNac-L-Ala-D-Glu; Tri: GlcNac-MurNac-L-Ala-D-Glu-meso-A2pm; Tetra: GlcNac-MurNac-L-Ala-D-Glu-meso-A2pm-D-Ala; Penta GlcNac-MurNac-L-Ala-D-Glu-meso-A2pm-D-Ala-D-Ala; Gly4(5): glicina en posición 4(5) de la cadena péptidica; Anh: residuo murámico 1-6 anhidro; LysArg: residuo Lis-Arg del ácido meso A2pm de la lipoproteína unida a mureina; A2pm: compuesto con un enlace mesoA2pm-mesoA2pm; los otros oligómeros presenta enlace normal mesoA2pm-D-Ala-mesoA2pm. Las cantidades de los compuestos fueron calculadas por integración de la respuesta-UV.

La abundancia relativa de los distintos grupos de muropéptidos refleja la estructura primaria de la mureína. Así, el grado de entrecruzamiento viene definido por la proporción de muropéptidos oligoméricos respecto al total, y la proporción de muropéptidos con ácido murámico anhidro, permite estimar la longitud de las cadenas que forman la mureína, ya que solo pueden aparecer en posición terminal de la cadena de mureína. Estos parámetros muestran variaciones a lo largo del ciclo celular,⁽¹⁷⁾ y en respuesta a modificaciones en las condiciones del medio de cultivo, lo cual refleja variaciones en el metabolismo de la mureína y su regulación.⁽⁶⁰⁾

En el sáculo, las cadenas glicosídicas están dispuestas de forma más o menos paralela y orientada preferentemente en sentido perpendicular al eje principal de la célula. A su vez, las cadenas glicosídicas lineales adquieren una conformación helicoidal sobre el eje glicosídico⁽⁷⁵⁾. Considerando como unidad el disacárido oligopéptido, el paso de hélice corresponde a 4.5 muropéptidos por vuelta, lo cual condiciona que las cadenas laterales peptídicas no aparezcan en un plano único, sino orientadas formando ángulos de 80° entre dos cadenas consecutivas.⁽⁴⁾

Por su parte la cadena peptídica presenta una estructura casi anular, lo cual permite que se establezca una interacción mediante puentes de hidrogeno entre el ultimo aminoácido de la cadena peptídica y el resto NAcMur del mismo muropéptido, estabilizando de esta manera su conformación. La estructura en hélice de las cadenas de mureína condiciona que el grado de entrecruzamiento no pueda ser teóricamente superior a un 50 - 60 %.⁽³⁾

La síntesis de los enlaces dap-dap es aun desconocida, tanto a nivel de el(los) enzima(s) que cataliza(n) la reacción, como en lo referente a su mecanismo. Se acepta como hipótesis de trabajo un mecanismo de transpeptidación análogo al descrito para las DD-transpeptidasas, solo que en este caso el enlace peptídico transferido seria el enlace LD entre los residuos de meso dap y D-ala en posición 4 de la cadena peptídica, y el grupo aceptor el grupo D-amino del residuo de dap de un muropéptido adyacente, al igual que en el caso de las DD-transpeptidasas.

A diferencia de las DD-transpeptidasas el(los) enzima(s) implicado(s) en la síntesis de puentes dap-dap parecen ser insensibles a penicilinas, posiblemente como consecuencia de la diferencia estereoquímica de los sustratos. En contraste con la formación de puentes D-ala-dap, los puentes de tipo dap-dap parecen sintetizarse mayoritariamente en etapas posteriores a la insolubilización de los nuevos precursores y de forma desacoplable de la síntesis de nuevo material.⁽⁶⁰⁾ Un aspecto a resaltar es el alto grado de redundancia en *E. coli*, de enzimas con actividad TGasa/ TPasa. Sin embargo, la redundancia a nivel de actividad enzimática no se corresponde con una redundancia funcional; cada PBP parece realizar una función específica en el metabolismo global de la mureína.

Las PBPs (ver tabla N° 01), miembros de la familia serin transferasas, catalizan la transferencia del grupo peniciloil de la penicilina a la serina de su sitio activo formando una acil enzima que se hidroliza muy lentamente. Son proteínas de membrana interna que exponen su sitio activo en el espacio periplasmico donde ejercen su función. Son responsables del ensamblaje y maduración del PG a través de actividades: DD-transpeptidasa (TPAsa), transglicosilasa (TGasa), DD-carboxipeptidasa (CPasa) y DD-endopeptidasa (EPasa), distinguiéndose dos grupos en función del tamaño: ⁽²⁹⁾

i) las de alto peso molecular (**High Molecular Weight**), mayor de 60 KDa, enzimas minoritarias, aunque esenciales para la viabilidad celular, distinguiéndose 3 dominios diferentes: el N-terminal que posee un péptido señal no procesable, responsable del anclaje a la membrana, fusionado a este se halla en el periplasma el dominio central que une penicilina (chaperona intramolecular, TGasa o de interacción con otras proteínas) y el C-terminal de unión a penicilina, incapaz de plegarse por si mismo (solo demostrado en PBP3), requiriendo el dominio central poco conservado. En base a la secuencia el dominio central, se han dividido en dos clases: **A** (1A y 1B, bifuncionales: TPasa y TGasa y esenciales) y **B** (2 y 3, PBP2 junto con RodA son fundamentales para el mantenimiento de la forma y la elongación celular y PBP3 y FtsW son fundamentales para la división celular. ⁽⁵⁾⁽³⁷⁾ y

ii) las de bajo peso molecular (**Low Molecular Weight**), enzimas monofuncionales: PBP 4, 5, 6, 6b, 7 y 8, relativamente abundantes en la célula, aunque ninguna es esencial para la viabilidad, son entidades de plegamiento autónomo, encargadas de controlar el grado de entrecruzamiento del PG ya que limitan las unidades pentapeptídicas disponible para la transpeptidación, en la hidrólisis de las cadenas de PG preexistentes para la inserción de cadenas nuevas y en el reciclado del PG. Las estimaciones del número de PBPs por célula sugieren que la síntesis e inserción de nuevo material ocurren en un número limitado de sitios, que se estima entre 20 y 100. ⁽⁶⁾⁽³³⁾⁽⁵⁵⁾

Se ha demostrado que durante la septación, hay dos PBP de alto peso molecular esenciales: PBP1b o PBP1a y PBP3. Se postula que una actividad DD-CPasa, es esencial para la formación del precursor del lípido II, que es usado como sustrato específico para PBP3. PBP5, que presenta la actividad DD-CPasa mayoritaria, afecta el diámetro celular, el contorno y la morfología de *E. coli*. ⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾

A fin de determinar el carácter esencial de PBP4B, se inactivara en las estirpes de *E. coli*: BW25113, RP1 y CS-802-2 ⁽¹⁹⁾, cada una con un genotipo particular, que nos permitirá obtener datos relacionados a su funcionalidad y esencialidad. BW25113 y RP1, servirán como control de la inactivación realizada en SL1344 (nuestro modelo patógeno de estudio) y CS-802-2, que presenta eliminado 8 genes codificantes para las siguientes PBPs : 1b (*mrcB*), 4 (*dacB*), 5 (*dacA*), 6 (*dacC*), 7 (*pbpG*), AmpH (*ampH*), AmpC (*ampC*) y DacD (*dacD*), nos permitirán determinar la esencialidad de la putativa actividad DD-CPasa del gen *pbp4b* en el entorno genético antes indicado. ⁽⁶²⁾⁽⁵⁷⁾⁽⁸⁵⁾

La estrategia empleada para lograr este mutante se indica en la figura N° 04, a través de la cual se construyeron 192 mutantes, de los cuales 8 genes codificantes para PBPs fueron eliminados en cada combinación posible. Las únicas combinaciones de eliminación que no pudieron ser generadas fueron PBP1a y PBP1b, por presentar actividades transglicosidasa / transpeptidasa y su función es requerida para el inicio/continuación de la elongación y entrecruzamiento de las cadenas de azúcares, resultando la inactivación de ambas proteínas en lisis celular.

El conocimiento a nivel morfológico que brindan estos mutantes, y dada la función en la que se encuentran involucradas las PBPs, señalan la importancia del estudio de las diferentes formas aberrantes que se generan al inactivar en conjunto las 8 PBPs en el mutante CS-802-2. Por ejemplo, la inactivación de PBP2, provoca que la célula pierda su forma bacilar, creciendo como esferas alargadas. La pérdida de PBP3 inhibe la reptación, causando que las células crezcan como filamentos alargados. PBP4, 5, 6 y DacD son CPasas, PBP4 y 7 son EPasas.

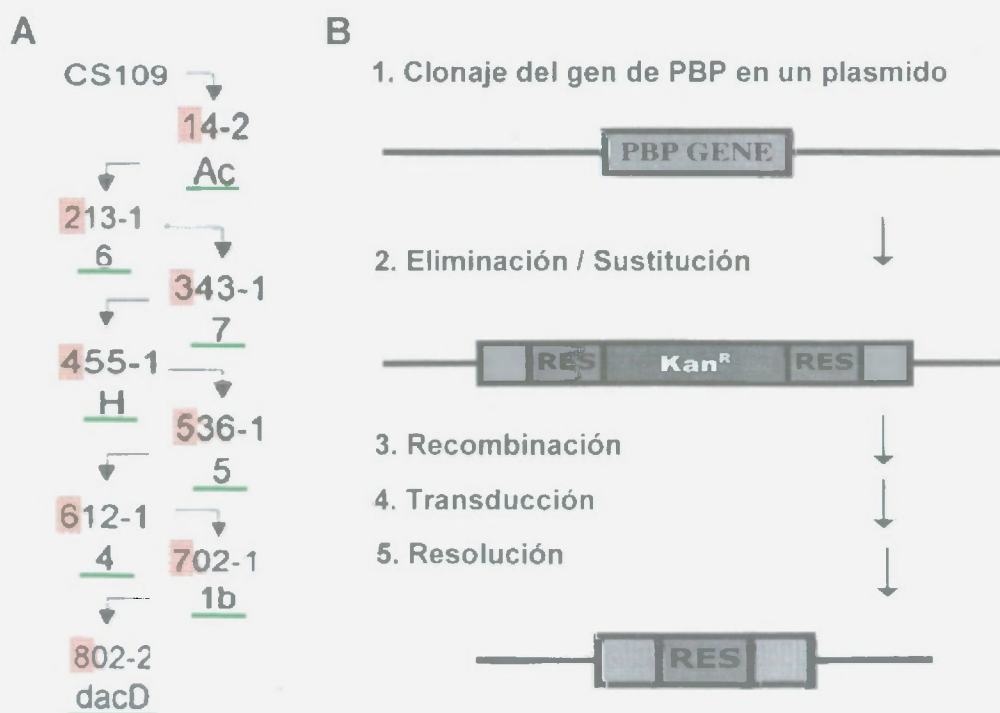


Figura N° 04. Esquema de la técnica para inactivar genes codificantes para PBPs en *E. coli*.

En A, se muestra la genealogía de CS-802-2. La estirpe parental es la CS-109. Los números sombreados en rojo, señalan el número de PBPs mutadas, las barras verdes señalan la PBP que ha sido inactivada, hasta la generación del mutante CS-802-2. En B, se muestra la estrategia de inactivación genética empleada. Kan^R, gen de resistencia a kanamicina.

Otro proceso molecular que centra nuestro interés es la división celular, este proceso involucra la partición del citoplasma en dos compartimentos, cada uno conteniendo una copia de la información genética de la célula bacteriana. En los organismos modelos de nuestro estudio: *E. coli* y SL1344, bacterias Gram negativas, este evento, también conocido como septación o constricción, involucra la invaginación circunferencial de las tres capas de la cubierta celular entre los cromosomas segregados.

Se ha demostrado que aunque el proceso de septación, replicación y segregación del cromosoma, no se hallan estrictamente emparejados durante la etapa de crecimiento exponencial, estos procesos se hallan muy bien coordinados. Cabe pensar que debe de existir además de un sistema de regulación temporal, otros mecanismos que regulen espacial y cuantitativamente, a fin de que estos procesos ocurran una sola vez durante el ciclo de división celular.

Los parámetros a tenerse en cuenta para lograr un entendimiento apropiado de estos procesos, son el tamaño celular crítico sobre la activación de los principales acontecimientos periódicos del ciclo celular, en el proceso de biosíntesis del PG, en el papel del anillo periseptal en la división y en la genética de la división celular bacteriana.

Como se ha indicado anteriormente, nuestro organismo modelo de patogenicidad, es la estirpe SL1344, se utilizan miembros del género *Salmonella*, dada su proximidad filogenética con el organismo estándar de estudio, *E. coli* y debido a que es uno de los patógenos más ubicuos de la naturaleza y SL1344 en particular, dado que es la versión no patógena en humanos de *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, permitiendo ello su fácil manipulación en nuestro laboratorio.

El género *Salmonella* comprende más de 2,200 serovariedades distintas, son bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, móviles por flagelos peritricos y un tamaño de 1 a 3 μm de longitud y 0.5 a 0.7 μm de diámetro, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Presenta un genoma de $4,5 \times 10^6$ pares de bases, codificando 3,000 genes y algunos miembros presentan un plásmido de virulencia de 60-120 Kb, requerido para la infección sistémica y pueden provocar enfermedades en el hombre ⁽¹⁰⁾

La salmonelosis es un problema de salud pública en países en desarrollo de Latinoamérica, Asia y África, con rangos de prevalencia desde 200 a 500 casos por cada 100,000 habitantes. Las estrategias actuales están dirigidas a mejorar las condiciones sanitarias y por otra parte a desarrollar vacunas con mayor eficacia que las diseñadas hasta ahora. Por esta razón, los estudios a nivel molecular de los mecanismos de patogenicidad de *S. typhi*, permitirá abordar el problema desde nuevas perspectivas.

A través del modelo de estudio in vivo de la virulencia de SL1344 (capaz de producir infección en ratones que se asemeja a la fiebre tifoidea producida en humanos por *S. Typhi*), utilizando animales de experimentación y líneas celulares eucarióticas, podremos evaluar el efecto de la mutación en los genes involucrados en la biosíntesis del PG (*pbp4b*) y división celular (*mraZ* y *mraW*).⁽¹³⁾⁽³¹⁾

La interacción de SL1344 con las células epiteliales fue descrita por primera vez en 1967⁽⁷⁴⁾, descubriéndose la capacidad de invadir enterocitos del epitelio intestinal en la región del íleo. En el desarrollo de este trabajo, emplearemos una herramienta mas potente: microscopia de fluorescencia y confocal a fin de determinar las interacciones Huésped-patógeno.⁽²²⁾ La mayoría de infecciones proceden por ingesta oral, requiriéndose una dosis infecciosa de 10^6 a 10^9 que le permita sobrevivir las defensas naturales del huésped, como por ejemplo: el pH del estomago. Estudios genéticos describen mecanismos de supervivencia basado en una respuesta adaptativa a la tolerancia al ácido (ATR).

Otros factores de defensa son: la flora habitual del intestino y los movimientos peristálticos. Una vez superada la barrera del pH ácido del estomago, alcanza el lumen del intestino delgado, donde se multiplica en competencia con la flora normal. La barrera intestinal es relativamente impermeable, compuesta principalmente por células columnares, globulares y células M, presentes en la placa de Peyer y encargadas de ingerir material del lumen intestinal para presentarlo a macrófagos y linfocitos, a través de las cuales logra migrar a los nódulos mesentéricos, llegando incluso a causar bacteriemia: infección del hígado, bazo y vesícula biliar, observándose hipertrofia del sistema reticulendotelial.⁽⁶⁶⁾

Este patógeno es capaz de eludir los mecanismos de defensa primaria del huésped (degradación por células fagocíticas como macrófagos y leucocitos polimorfonucleares), invadir macrófagos, sobrevivir y reproducirse en su interior a través de vacuolas, provocando apoptosis. Varios factores de virulencia influyen el crecimiento y supervivencia de SL1344 en el macrófago. La capacidad de sobrevivir y crecer dentro de macrófagos es requerida para el establecimiento de la enfermedad en el modelo animal (normalmente se emplea ratones BalB/C). El regulador de dos componentes, PhoP/PhoQ (homólogo a otros sistemas descritos en patógenos de animales y plantas), regula la expresión de genes implicados en virulencia y supervivencia en macrófagos.

La penetración de células epiteliales de la mucosa intestinal constituye el primer paso en el establecimiento de la infección por SL1344. Esta interacción fue examinada in vitro utilizando monocapas de células epiteliales que servían de modelo para el estudio de la penetración intestinal. Las células utilizadas eran capaces de formar microvellosidades bien desarrolladas y uniones estrechas, definiendo así un dominio apical y otro basolateral lo cual simula células columnares del epitelio intestinal.

El acercamiento de la bacteria a la superficie induce degeneración de las microvellosidades por influjo de Ca^{2+} extracelular originándose pseudópodos (“ruffles”) que engoblan al patógeno ⁽²⁶⁾, quedando incluida en una vacuola, aparece también una marcada actividad endocítica en toda la zona. Todos los cambios en la estructura de la superficie se deben a reordenamientos de elementos del citoesqueleto inducidos por SL1344, concretamente filamentos de actina. Una vez que la bacteria ha sido internalizada el citoesqueleto vuelve a su distribución habitual. ^{(21) (24) (39)}

Dentro del conjunto de señales que SL1344 envía a la célula en el proceso de adherencia e ingestión se describe la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En células HeLa, por el contrario, no existe esta activación. Como consecuencia de la interacción bacteria - célula, se activaría en la bacteria un sistema tipo III de secreción de proteínas (TTSS), capaz de secretar e inyectar proteínas de virulencia “efectoras” en el citosol de células hospedadoras. En SL1344, se han descrito 5 islas de patogenicidad (agrupamiento de genes de virulencia): SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5. SPI-1 contiene los genes *inv* y es requerida para la entrada del patógeno en la célula eucariota. ⁽³⁰⁾ SPI-2 codifica para componentes de un sistema de secreción tipo III esenciales para la supervivencia en macrófagos y para el establecimiento de infección sistémica en ratones. ⁽¹¹⁾

Un importante factor de virulencia en SL1344 es su capacidad de replicación intracelular en células epiteliales. Estudios realizados en mutantes de SL1344, los cuales normalmente invaden células no fagocíticas en cultivo, pero que no son capaces de proliferar intracelularmente, sugieren la existencia de un loci genético específico y necesario para ser capaz de multiplicarse intracelularmente y conferir a SL1344 el carácter patogénico. ⁽⁷⁸⁾

El genoma de *Salmonella* contiene 12 genes que podrían codificar PBPs (no está presente *ampC*), de las cuales ocho podrían ser homologas a las PBPs 1a/1b, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de *E. coli*, y estarían codificadas por los genes *ponA/ponB*, *pbpA*, *pbpB*, *dacA*, *dacB*, *dacC* y *pbpG*. Sin embargo, los genes que codifican para dichas PBPs no han sido identificados en STM, ni se han construido aun mutantes en genes para PBPs en STM, dada la alta homología de secuencia con las PBPs de *E. coli*, para las que hay estudios exhaustivos.

La comparación del genoma de *E. coli* K-12 (ECO) con los de las especies de SL1344, Typhi y Paratyphi (SAL), revela que existen al menos 394 zonas mayores de 400 bp en ECO, para las que no existen homólogos en los genomas de las tres SAL, y 160 zonas ausentes en ECO, pero con alta homología entre todos los genomas SAL.

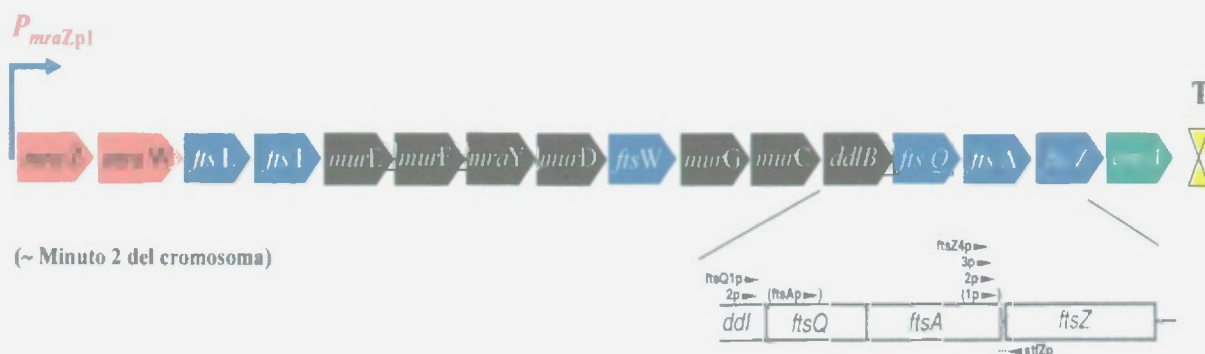


Figura N° 05. Agrupamiento genético del minuto 2 del cromosoma de *E. coli*. La orientación de las flechas indica el sentido de la transcripción. Se muestra además los promotores internos presentes en la región *ddlB-ftsZ*. Se aprecia el único terminador transcripcional (T) presente al final del cluster.

El agrupamiento genético involucrado (ver figura N° 05) en el proceso de división celular (división cell wall (*dcw*) cluster) en SL1344, se halla localizado en el minuto 2 del mapa genético, y contiene un grupo de 16 genes (con solapamientos y todos transcritos en la misma dirección) codificantes para proteínas involucradas en los procesos de biosíntesis del PG y división celular.^{(20) (44) (83)} Existen promotores internos y un simple terminador de la transcripción, sugiriendo ello la posibilidad de que se genere un transcrito grande (iniciando en *mraZp1* y abarcando todo el agrupamiento genético *dcw*) y un transcrito parcial.^{(32) (49) (76)}

El orden de los genes en el agrupamiento genético *dcw* parece estar altamente conservado en bacilos y bacterias filamentosas (las células bacilares crecen principalmente por inserción de material nuevo en las paredes laterales) y disperso en bacterias con otras formas, como por ejemplo cocos, helicobacterias y espiroquetas (las células cocoides crecen principalmente por incorporación de nuevo material en el septo producido para la división celular).^{(18) (51)}

Este ordenamiento genético podría facilitar el ensamblaje cotranslacional, no solamente de suficientes precursores y enzimas biosintéticas para la división celular, sino también de las enzimas sintetizadoras de precursores para el PG para formar un complejo⁽⁵⁰⁾. La conservación del orden de los genes es una indicación de las posibles interacciones entre las proteínas codificadas en el cluster.^{(16) (43)}

La función de los 2 primeros genes del agrupamiento genético *dcw*, *mraZ* y *mraW*, no se conoce exactamente, se sabe que *mraW* esta altamente conservada y exhibe una actividad metiltransferasa dependiente de S-adenosil-metionina sobre sustratos localizados en membrana.^{(12) (25)}. Se sabe además que una deficiencia en S-Adenosil metionina sintetasa interrumpe el ensamblaje del anillo septal en *E. coli*.⁽⁸⁰⁾

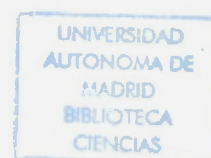
Los genes *mur* B, C, D, E, F y G, juntos con los genes *mraY* (esencial para el crecimiento celular en *E. coli*)⁽⁸⁾ y *ddlB*, codifican para enzimas responsables de precursores de la síntesis de mureína⁽³⁵⁾. Los genes *fts* L, I, W, Q, A y Z, codifican proteínas que se localizan en membrana, en el centro de la bacteria, formando un anillo, que se cree conduce la septación durante el proceso de división.⁽⁴⁵⁾⁽⁵³⁾⁽⁸⁵⁾

En la actualidad, en función de las actividades biológicas que realizan cada uno de las enzimas involucradas tanto en el proceso de división celular como en la síntesis del PG, se vienen desarrollando de manera creciente, el diseño de nuevos y diferentes inhibidores de estos procesos,⁽⁷⁰⁾ este aspecto permite remarcar la importancia de esta investigación, continuando en la búsqueda de nuevas dianas antimicrobianas mas efectivas y selectivas, que nos permitirán disponer de un arsenal cada vez mejor en la lucha contra los patógenos humanos.

Dado que la patogenicidad de SL1344 viene dada por su capacidad de invadir las células huéspedes no fagocíticas, hemos diseñado un mutante de SL1344 para genes implicados en el proceso de división celular y biosíntesis de PG, empleando una técnica simple y efectiva⁽⁵⁰⁾⁽⁸¹⁾, obteniéndose la correcta sustitución y eliminación de los genes cromosomales codificantes para PBP4B, *MraZ* y *MraW* en SL1344, a fin de determinar su posible carácter esencial a través de ensayos *in vivo* e *in vitro*.⁽⁵¹⁾

Especulamos que: 1. La expresión de los genes codificantes para PBP 4B y *MraZ* y *MraW* en SL1344 pueden responder en función del ambiente intracelular (*in vivo* e *in vitro*). 2. La función de esas proteínas pueden ser fundamentales para la supervivencia y/o adaptación en estas condiciones y 3. Aquellas proteínas cuya función sea esencial *in vivo* serian importantes blancos de acción específicos para nuevos antibióticos.

Por tanto, el comprender cuales son los mecanismos moleculares, y las proteínas implicadas en ellos, por los cuales SL1344 se divide dentro de la célula eucariota, puede aportar las claves para el diseño de estrategias terapéuticas que puedan limitar la infección y que impedirían en gran medida la aparición de resistencias.



OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de la implementación de la metodología de enseñanza por competencias en el aprendizaje de los estudiantes de la asignatura de Matemáticas en el nivel de secundaria.

Una hipótesis postulada durante mucho tiempo es la esencialidad de la actividad DD- carboxipeptidasa en el proceso de biosíntesis del peptidoglicano, actualmente se cuenta con una serie de mutantes que presentan un entorno genético en el cual se han inactivado una serie de PBPs, uno de estos mutantes presenta inactivada toda actividad DD-carboxipeptidasa conocida (CS-802-2), salvo el gen que codifica para una putativa PBP4B, por ello se pretende:

1. Reemplazar e inactivar el gen cromosomal que codifica para PBP4b en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 y diversas estirpes de *Escherichia coli* BW 25113, RP1 y CS-802-2

Respecto a los mutantes generados en SL1344, se pretende determinar si hay PBPs que, siendo dispensables *in vitro*, son requeridas para el crecimiento *in vivo* y determinar la implicación de los genes inactivados, en la invasión y proliferación de la infección en el modelo de ratón.

Respecto a los mutantes generados a partir de CS-802-2, se evaluará la esencialidad de la actividad DD-carboxipeptidasa de PBP4b, así mismo se analizará los efectos en la morfogénesis que pueda causar la eliminación del mencionado gen y se compararán con los mutantes obtenidos en la estirpe de BW25113 y RP1.

2. Realizar ensayos de infección *in vitro* en líneas celulares eucariota: NRK, 3T3 y HeLa, e *in vivo* (modelo en ratón) empleando la estirpe wild type SL1344 y los mutantes derivados del proceso de reemplazo e inactivación del gen *pbp4b*.
3. Clonar, expresar y purificar MraW de *Lactococcus lactis* MG8 y SL1344 a fin de determinar su actividad enzimática y su funcionalidad.

Muchos de los genes involucrados en el proceso de división celular en bacterias Gram negativas como *E. coli* y SL1344 (organismos modelos en nuestra investigación) se encuentran localizados en pocos cluster en el cromosoma, uno de ellos, presente en el minuto 2 del cromosoma, quizás el mejor caracterizado, designado como *dcw* (Division Cell Wall), cuya importancia radica en que contiene 6 genes *fts* (Filamenting Temperatura Sensitive) que intervienen en el proceso de división celular, además de 7 genes involucrados en la biosíntesis de mureína (genes *mur*, *mraY* y *ddl*) y un gen (*envA*) involucrado en biosíntesis de lipopolisacarido, de los cuales, al menos 9 de los primeros genes se hallan bajo el control del promotor Pmra, por esta razón se intentará :

4. Obtener el correcto reemplazo e inactivación de los genes *mraZ* y *mraW*, presentes al inicio del cluster *dcw* en SL1344.
5. Realizar ensayos de infección in vitro en líneas celulares eucariota: NRK, 3T3 y HeLa, e in vivo (modelo en ratón) empleando la estirpe wild type SL1344 y los mutantes derivados del proceso de reemplazo e inactivación de los genes cromosomales *mraZ* y *mraW*, a fin de determinar si dicha mutación afecta la capacidad de invasión y proliferación intracelular in vitro.

Haciendo uso de la técnica de análisis del peptidoglicano por HPLC, la cual nos permite obtener datos importantes sobre la composición de los muropéptidos que conforman la estructura de esta macromolécula, se pretende:

6. Analizar la variación en la composición de muropéptidos del peptidoglicano por HPLC de los mutantes generados del reemplazo e inactivación en *E. coli* y SL1344 de los genes cromosomales *pbp4b*, *mraZ* y *mraW*.

Trabajos de investigación anteriores, realizados en nuestro laboratorio, mostraron que *MraW* de *E. coli* presenta una posible actividad metil transferasa sobre PBP3, por ello, dado el rol fundamental de esta PBP en el proceso de división celular, se planteo profundizar en el estudio de *MraW* de otros organismos, como *Lactococcus lactis* y SL1344 y como objetivo principal se pretende:

7. Clonar, expresar y purificar *MraW* de *Lactococcus lactis* y SL1344 a fin de determinar su actividad enzimática y su funcionalidad.
8. Sustituir y eliminar el gen *gidB*, que presenta una actividad putativa similar a la actividad que investigamos en *MraW*, en un contexto genético en el cual se halla eliminado los genes *mraZW*.

En colaboración con el grupo de investigación de la Universidad Paris-Sud de Francia, que habia logrado clonar el gen codificante para MurF (una de las ligasas sitio especificas involucradas en la etapa citoplasmática de biosíntesis de peptidoglicano) bajo el control de un promotor inducible por IPTG, planteamos el siguiente objetivo:

9. Evaluar cual es el efecto de la sobreexpresion de MurF en un contexto genético en que se presenten eliminadas todas las LMW PBPs (mutantes CS-802 y DV-900) sobre la estructura del PG.

MATERIALES Y METODOS

RESUMEN: Este documento describe los materiales y métodos utilizados en el estudio de la influencia de la temperatura en la resistencia a la tracción de los cables de acero. Se utilizaron cables de acero de 19 alambres y se realizaron ensayos de tracción a diferentes temperaturas. Los resultados muestran que la resistencia a la tracción disminuye al aumentar la temperatura.

MATERIALES Y METODOS

RESUMEN: Este documento describe los materiales y métodos utilizados en el estudio de la influencia de la temperatura en la resistencia a la tracción de los cables de acero. Se utilizaron cables de acero de 19 alambres y se realizaron ensayos de tracción a diferentes temperaturas. Los resultados muestran que la resistencia a la tracción disminuye al aumentar la temperatura.

1. Material Biológico.

1.1 Estirpes Bacterianas.

Tabla N° 02: Estirpes bacterianas empleadas

Estirpe	Genotipo	Origen
CS109	W1485 <i>glnV rpoS rph</i>	Este trabajo
CS802-2	CS-109, Δ <i>ponB</i> , <i>dacA</i> , <i>dacB</i> , <i>dacC</i> , <i>dacD</i> , <i>pbpG</i> , <i>ampH</i> , <i>ampC</i>	Dr. Young K.
BW25113	<i>lacI^q rrnB₁₁₄ ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>	Este trabajo
BW25113 KF	BW25113 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a kanamicina en orientación forward.	Este trabajo
BW25113 KR	BW25113 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a kanamicina en orientación reverse.	Este trabajo
BW25113 CF	BW25113 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación forward.	Este trabajo
BW25113 CR	BW25113 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación reverse.	Este trabajo
BW25113 Δ 4B	BW25113 Δ 4B	
RP1	K-12, F-, <i>thrA</i> , <i>leuA</i> , <i>proA</i> , <i>lysA</i> , <i>dra</i> , <i>drm</i>	Este trabajo
RP1 KF	RP1 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a kanamicina en orientación forward	Este trabajo
RP1 KR	RP1 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a kanamicina en orientación reverse.	Este trabajo
RP1 CF	RP1 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación forward	Este trabajo
RP1 CR	RP1 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación reverse.	Este trabajo
RP1 Δ 4B	RP1 Δ <i>pbp4b</i>	Este trabajo
DV900	CS-802-2, Δ <i>pbp4b</i> .	Este trabajo
DV900-KF	CS-802-2 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a kanamicina en orientación forward.	Este trabajo
DV900-KR	CS-802-2 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a kanamicina en orientación reverse.	Este trabajo
SL1344	<i>hisG</i> , <i>rpsL</i> / <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Este trabajo
SL1344 KF::4b	SL1344 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a kanamicina en orientación forward.	Este trabajo
SL1344CF::4b	SL1344 que presenta el gen <i>pbp4b</i> sustituido por el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación forward.	Este trabajo
SL1344 Δ 4b	SL1344 Δ <i>pbp4b</i>	Este trabajo
SL1344-CF::ZW	SL1344 que presenta los genes <i>mraZW</i> sustituido por el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación forward.	Este trabajo
SL1344 Δ ZW	SL1344 Δ <i>mraZW</i>	Este trabajo
SL1344CR	SL1344 que presenta el gen <i>gidB</i> sustituido por el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación reverse.	Este trabajo
SL1344 Δ <i>gidB</i>	SL1344 Δ <i>gidB</i>	Este trabajo
SL1344 Δ ZWCF	SL1344 Δ ZW que presenta el gen <i>gidB</i> sustituido por el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación reverse.	Este trabajo
SL1344 Δ ZW Δ <i>gidB</i>		Este trabajo
INV α F'	F' <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 λ -	Invitrogen
DH5 α	E. coli, F' ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> , <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk- mk+ <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	CBM S.O
BL21(DE3)	E. coli F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _K - m _B -) <i>gal l</i> (DE3)	CBM S.O

1.2 Bacteriófago:

Fago P1 (fago transductor generalizado)

1.3 Líneas celulares eucarióticas :

Líneas no fagocíticas: **NRK** (Normal Rat Kidney, fibroblasto), **NIH/3T3** (fibroblasto de embrión de *Mus musculus*) y como control positivo de proliferación intracelular, **HeLa** (epitelio de carcinoma cervical humano).

1.4 Animales de experimentación:

Ratones Bal b/c, hembras, de color blanco y 4 semanas de edad.

1.5 Plásmidos:

Tabla N° 03. Plásmidos empleados en la investigación

Nombre	Características relevantes	Referencia
pKD3	Presenta el gen de resistencia a cloranfenicol flanqueado por regiones FRT (Flipase Recognition Target), de aprox. 1,1 Kbp.	Dominique Mengin-Lecreulx Univ.Paris-Sud (Francia)
pKD4	Presentan el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por regiones FRT, aprox. 1,6 Kbp.	
pKD13		
pKD46	Plasmido termosensible resistente a ampicilina, expresa la recombinasa red del fago λ, inducible por arabinosa.	
pCP20	Plasmido termosensible resistente a ampicilina, expresa la FLP (Flipasa que reconoce regiones FRT flanqueando los genes de resistencia a antibióticos).	
pET28b	Vector resistente a kanamicina, permite añadir en extremo amino o carboxilo, un tag de histidina.	Novagen
pK18	Vector derivado de pUC118, presenta Prom Lac y gen de resistencia a kanamicina interrumpiendo el gen de resistencia a ampicilina	Dr. J. Berenguer CBM-SO
pCR2.1	Vector linealizado, con timina sobresaliente en cada extremo, presenta gen lacZ, resistencia a kanamicina y ampicilina.	TA Cloning Kit (Invitrogen)
pMLD116K	Vector resistente a kanamicina, presenta promotor TRC para expresar MurF	D. Menguin-Lecreux
pBAD33	Vector resistente a cloranfenicol, presenta promotor inducible por L-arabinosa	Este trabajo

1.6 Cebadores:

Tabla N° 04: Cebadores usados en la inactivación del gen *pbp4b* en *E. coli* y SL1344.

Cebadores	Secuencia
Eco-4b-H1P1	acgctctttggctgccgtaacgtcaatctggactgatactgtaggctggagctgcttc
Eco-4b-H2P2	gcactctcagaccagccagtaacattactgactggcctttcatatgaatacctccttag
Eco-4b-H1P2	acgctctttggctgccgtaacgtcaatctggactgataccatgaatacctccttag
Eco-4b-H2P1	gcactctcagaccagccagtaacattactgactggcctttgttaggctggagctgcttc
Stm-4b-H1P1	gatatgatttgacggccggcgtgagactgagggaatcatcgttaggctggagctgcttc
Stm-4b-H2P2	ccaaactggctgcgccaataacgcctacagagataggctccatgaatacctccttag
Stm-4b-H1P2	gatatgatttgacggccggcgtgagactgagggaatccatgaatacctccttag
Stm-4b-H2P1	ccaaactggctgcgccaataacgcctacagagataggctcgttaggctggagctgcttc
ForA-Eco	ggcatcctccggccatggcggttatgctggc
ForB-Eco	cctcggctcgtcttatcaagcagccagcgc
RevC-Eco	gtgggtccacgtaggctgataagcgtagcgc
ForA-Stm	gaccatattctcttccgggcccagagtc
ForB-Stm	cctcggctcgtcttatcaagcagccagcgc
RevC-Stm	cacgtactacgtgtacgctccggttttgcgcg
pKD13 K1	cagtcatagccgaatagcct
pKD13 K2	cggcgccctgaatgaatgc
pKD13 Kt	cggccacagtcgatgaatcc

Tabla N° 05: Cebadores de verificación usados en la inactivación de *pbp4b* en CS-802-2.

Cebadores	Secuencia	Tamaño del fragmento
Eco-ponA-F	caaggggcaagtaccattacc	2180 bp
Eco-ponA-R	atcgattatggctgtccac	
Eco-ponB-F	aggggtagctgacgtgacgc	196 bp
Eco-ponB-R	gcgccagtgttggttacgcc	
Eco-dacB-F	cggcgacttaagggtagctt	203 bp
Eco-dacB-R	acatccagttcgagttatgc	
Eco-dacC-F	acttatcatagggcatataa	204 bp
Eco-dacC-R	cggtaggtttaatttatcgg	
Eco-ampH-F	ttgcctctgatatgtcgatc	222 bp
Eco-ampH-R	agaagttctcgctgctttgcg	
Eco-ampC-F	tactttacgtgggctatgcg	269 bp
Eco-ampC-R	atacatatcgccggtttgcca	
Eco-pbpG-F	aatgaacaacacgcgcttgt	272 bp
Eco-pbpG-R	gtataaagcaccggagacgtt	
Eco-dacD-F	atgccgagaagctgcattca	239 bp
Eco-dacD-R2	cgtagttcatgacgcctccat	
Eco-mtgA-F	gagcgcaatgaaaaccgtatt	298 bp
Eco-mtgA-R	catcagtgagtcagagggtat	

Tabla N° 06: Cebadores usados en la inactivación de genes *mraZW* en SL1344.

Cebadores	Secuencia
Stm-mzw-H1-P1	cttcgagtggaatttgtgggataaagtggtaagaaggggtgagactggcgtgtacgctggagctgcttc
Stm-mzw-H1-P2	cttcgagtggaatttgtgggataaagtggtaagaaggggtgagaatggccatatgaatatcctccttag
Stm-M2-H2-P2	cctctctgcgatacgcagaactgaactacgggcccaggagatttcagctagtgtaggctggagctgcttc
Stm-M2-H2-P1	cctctctgcgatacgcagaactgaactacgggcccaggagatttcagctagtgtaggctggagctgcttc
ForA-mzw-SL1344	ggtaagcgttgtgacttgctt
ForB-mzw-SL1344	gtaggcgtggtatagcaggc
RevC-mzw-SL1344	aaggcatggcgtcgttgctt
RevD-mzw-SL1344	aggttgccattcaatgtcc

Tabla N° 07: Cebadores usados en la RT-PCR cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa:

Cebadores	Secuencia
STM-RpoD-F (C-98)	agtcacagctgaaacttctgtca
STM-RpoD-R (C-99)	tcgtactgttccagcagataggta
PBP3-SL1344-F8	gttatctcggtatggaacgggtatc
PBP3-SL1344-R9	tttgataagtggcttaccggtc
STM-FTSZ-F	taccgtgatgtctgaaatgg
STM-FTSZ-R	cctgtggtgtattgtcgta
STM-FTSW-F	ttgatgaggtgcgaaataac
STM-FTSW-R	accgataaacccagttctt
STM-MraZ-F	atcgacagcgtaccggtaaa
STM-MraZ-R	cgcgtacgcgacgttcta
STM-MraW-F	ggcgtctcttcctcgagctt
STM-MraW-R	accagggccatatccgttcc

Tabla N° 08: Cebadores usados en el clonaje de *mraW* y PBP4B:

Cebadores	Secuencia
NdeI-II- <i>mraW</i> -F2	gccatagccaaaaacaatagcatttaagca
Hind III- <i>mraW</i> -R2	gcaagcttctatcgaagtattctttggc
PBP4B-Eco-NheI-F	atggctagcatgaaacggacaatgctctat
PBP4B-Eco-Hind III-R	gacaagctttattactctgctttaacgc

Tabla N° 09: Cebadores usados en la sustitución e inactivación de gen *gidB*:

Cebadores	Secuencia
STM-GidB-H1P1	itaaactttgttgacttaataaccagatgccgctcgggtgtaggctggagctgcttc
STM-GidB-H2P4	atgaccgtgctcaacaaactctctcgtctgctggctgatgattccgggatccgctcgacc
STM-GidB-ForA	gctgaaatgcgttatacctgt
STM-GidB-RevC	ctacaaattttagggcccgat

1.7 Anticuerpos

Tabla N° 10: Antiseros empleados

Nombre	Característica	Referencia
α 6X His-Tag	Anticuerpo policlonal que reconoce las 6 histidinas de proteínas recombinantes	Santa Cruz Biotechnology, Inc
GAR-HRP	Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano. Empleado como anticuerpo secundario en western-blot.	Biorad

2. Sustitución e inactivación genética en *E. coli* y SL1344.

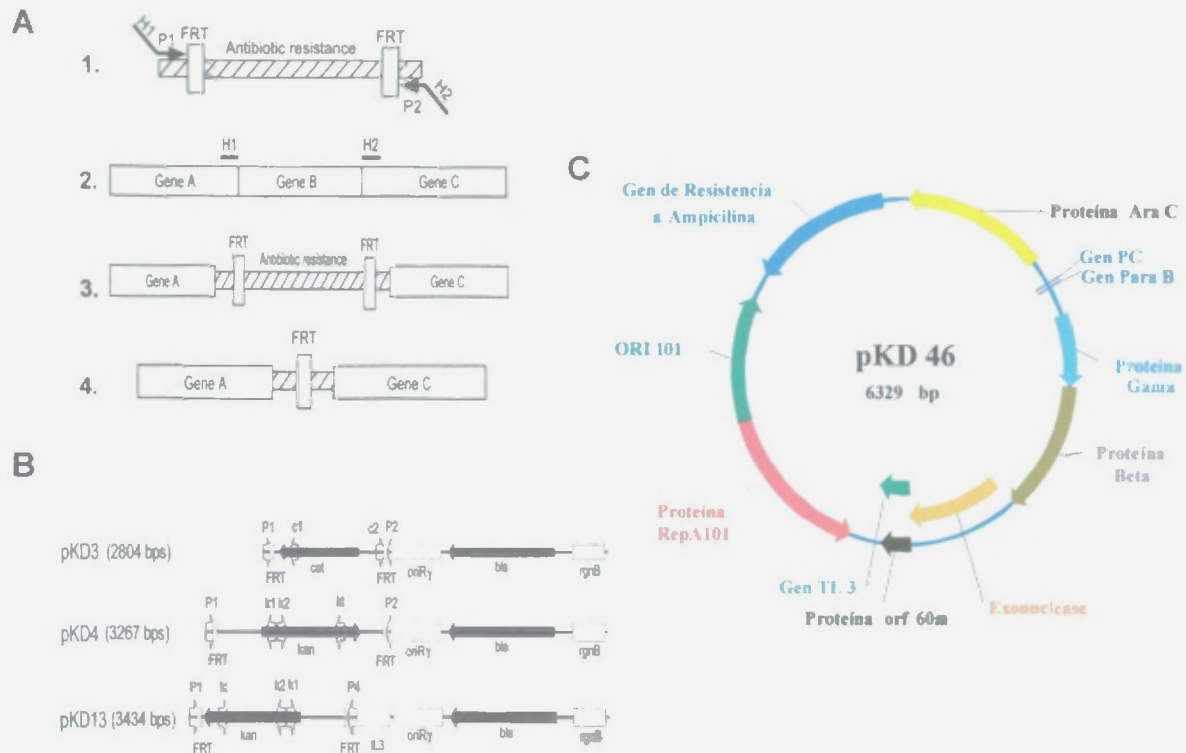


Figura N° 06. Técnica de sustitución e inactivación genética descrita por Datsenko K. ⁽⁸¹⁾

(A). Esquema de la técnica de inactivación genética empleada. (1) Amplificación por PCR usando cebadores de 70 nt. de largo, que amplifican los genes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina que se hallan flanqueados por regiones FRT (FLP Recognition Target) (vectores moldes se muestran en B) y regiones homologas a los genes adyacentes al gen de interés, transformando (2) luego con estos genes de resistencia a antibióticos digeridos por DpnI y purificados, en estirpes bacterianas conteniendo el vector pKD46 de bajo número de copia y termosensible que codifica para la recombinasa Red del Fago λ que se encuentra bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (C). y se seleccionaron los mutantes generados por su resistencia al antibiótico (3). Estos genes de resistencia fueron luego eliminados (4) empleando un vector termosensible que codifica para una recombinasa FLP (pCP20).

(B) Muestra la representación lineal de los plásmidos molde empleados. Las flechas muestran la localización y orientación de los sitios de hibridación P1, P2 y P4, así como los cebadores de verificación k1, k2, c1, c2 y kt.

Los materiales químicos, reactivos y otros, empleados fueron: Arabinosa 1 mM, enzima de restricción DpnI, buffer 4 (BioLabs), Tth y Taq polimerasa (Biotools) y reactivos para PCR y kit de purificación de ADN (Promega). Se usaron cebadores de 70 a 80 nucleótidos (ver tablas N° 5, 7 y 10) para generar por PCR, los genes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina flanqueados por las regiones FRT (Flipase Recognition Target), usando como molde los plásmidos pKD3 y pKD4 respectivamente (en el caso de que el contexto genético señale la orientación inversa del gen a inactivar, se empleo el plásmido pKD13).

En estos cebadores, ECO, hace referencia a su generación a partir del genoma de *E. coli*, de igual manera STM, hace referencia al origen a partir del genoma de SL1344. La región denominada H1 o H2 (permite la inserción del gen de resistencia en sentido forward o reverse por recombinación homologa) que reconoce secuencias adyacentes al gen a inactivar, y la región denominada P1 o P2, reconocerán secuencias en los plásmidos que contienen los genes de resistencia.

Mediante PCR empleando estos cebadores, se obtiene la amplificación del gen de resistencia flanqueado con regiones FRT y con secuencias de homología a las zonas adyacentes al gen a inactivar. Los amplicones se purificaron empleando el kit de purificación de DNA de Promega, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se realizó luego una digestión con Dpn I, incubándose a 37 °C durante 3 horas a fin de evitar la generación de falsos positivos. Luego, se purificó con el kit de Promega y se transformó por electroporación (2500V y 5milisegundos) en bacterias electrocompetentes *E. coli* y SL1344 conteniendo pKD46⁽¹⁵⁾, seleccionando los transformantes en placas de agar LB suplementado con el antibiótico que corresponda. En estos clones se verificó la inactivación del gen de interés por PCR (ver cebadores descritos en tablas N° 4, 5, 6, y 9), así como la pérdida de resistencia a ampicilina conferida por el pKD46.

A partir de los clones verificados, se realizó la preparación de células electrocompetentes y se transformaron con pCP20, seleccionándose los transformantes resistentes a ampicilina, incubándose a 30°C y luego incrementando la temperatura a 37 °C a fin de eliminar el pCP20, seleccionándose los clones sensibles a cloranfenicol (kanamicina) y ampicilina, verificándose la eliminación del gen de resistencia al antibiótico por PCR.

3. Medios y condiciones de cultivo:

3.1 Medios de cultivo para el crecimiento de las estirpes de *E. coli* y SL1344.

Se uso el medio de Luria & Bertani (LB) ⁽⁴²⁾ y medio mínimo M9 ⁽⁵¹⁾, suplementado con kanamicina 30 µg/ml, ampicilina 100 µg/ml o cloranfenicol 20 µg/ml, según corresponda al mutante ensayado. En el caso de placas, se añadió 1,5% de agar a estos medios.

3.2 Condiciones de crecimiento bacteriano:

Los cultivos se crecieron durante toda la noche a 37 °C en un baño de agua con agitación a 180 rpm (preinoculo). Los cultivos de las estirpes a ser empleadas en los ensayos de infección y proliferación intracelular se crecieron en matraces de 200 ml, se les añadió 20 ml de LB, se sembró una colonia y se incubaron a 37°C durante toda la noche sin agitación (ya que se perderían ciertas estructuras como flagelos, necesarios para lograr la infección de las células).

En los ensayos de sobre expresión de proteínas, se probaron diferentes temperaturas de crecimiento: 21, 30 y 37 °C. La selección de transformantes con inserto se realizo en placas conteniendo X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) (40 µg/ml). El crecimiento de los cultivos se realizo midiendo la D.O a 600 nm en espectrofotómetro Hitachi.

3.3 Medio de cultivo y condiciones de crecimiento de las líneas celulares eucariotas:

Se empleo DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) con 10% de suero bovino fetal (FBS de GIBCO), glutamina, aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, para las 3 líneas celulares ensayadas, las que crecieron en incubador NAPCO modelo 5415 a 37°C en atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, cambiándose un 70% del medio de cultivo cada 2 o 3 días para renovar los nutrientes y evitar la completa eliminación de los factores de crecimiento.

Cuando la confluencia de la placa estuvo entorno al 70-90 %, se realizo el pase correspondiente, para ello se elimino el medio de cultivo totalmente y se lavo 2 veces con PBS 1X estéril, añadiéndose luego 3 ml de tripsina-EDTA y manteniendo durante 3-5 minutos en la estufa a 37°C (para levantar las células), luego de lo cual se resuspendieron por pipeteo y el total del homogenizado se adiciono a 7 ml de DMEM-10 %BFS (para reducir el efecto de la tripsina) y se centrifugo a 1250 rpm durante 6 minutos a 4°C. Se descarto el sobrenadante y se resuspendió suavemente en 5-10 ml de DMEM-10% BFS (en función del pellet que se obtenga) de manera que se obtuvieron células aisladas sin sufrir lisis y finalmente se repartió el volumen entre el numero de placas que se necesitaron generar y se le adicionó DMEM-BFS 10% manteniéndose en incubación a 37°C con 5% de CO₂.

4. Ensayo de infección en células HeLa, NIH/3T3 y NRK por SL1344 y mutantes derivados.

4.1 Preparación de las placas p24 para los ensayos de infección :

Se emplearon células crecidas en placa p100 a una confluencia del 80%, para preparar las placas multipocillos p24. Se precalentó a 37°C el medio de cultivo, la solución de tripsina-EDTA y el PBS 1X; se decanto el medio de la placa, lavando 2 veces con PBS 1X estéril y se añadieron 3 ml de tripsina-EDTA y se mantuvo en reposo de 3-5 minutos. Se resuspendió suavemente por pipeteo y se adiciono este homogenizado a 7 ml de DMEM-BFS 10%, tras centrifugar a 1250 r.p.m durante 6 minutos a 4°C, se descarto el sobrenadante y se resuspendió suavemente con 6 ml de DMEM-BFS 10%.

Se tomo 1 ml de la resuspensión y se paso a tubo Falcón conteniendo 11 ml de DMEM-BFS 10% homogenizando suavemente, Se agrego 0.5 ml en cada uno de los pocillos de la placa p24 y se observo al microscopio la confluencia aproximada y la aparición de células aisladas, cuando se observo células aglomeradas se añadió una gota de DMEM-BFS 10% y se incubo a 37°C con 5% de CO₂. Es importante para obtener un buen crecimiento de las células en las placas p24 iniciar la preparación de la placa aproximadamente 16 horas antes del inicio del experimento.

4.2 Preparación del Inoculo de Infección

Como control de infección se uso la estirpe SL1344. Aproximadamente 16 horas antes del inicio del experimento se sembró una colonia del SL1344 y de los mutantes derivados de la sustitución e inactivación genética y se incubo a 37°C sin agitación. Se tomaron 72 µl de cada cultivo y se adicionaron a 6 ml de DMEM-BFS 10% (volumen para infectar 12 pocillos).⁽⁶⁷⁾

4.3 Ensayo de Infección:

Se retiro por aspiración el medio de cada uno de los pocillos de la placa p24, se agregó 0.5 ml del inoculo de infección a cada pocillos que corresponda (se realizo el ensayo por duplicado) (aproximadamente se infecto con 5-6 µl de cultivo) y se incubo durante 30 a 40 minutos. Se aspiro el medio y se agrego 0.5 ml del medio DMEM-BFS 10% - gentamicina 150 µg/ml para matar las bacterias extracelulares sin afectar la viabilidad de la bacteria intracelular⁽²³⁾. Se Incubo a 37°C con 5% de CO₂.y se realizaron controles de crecimiento periódicos a las 2, 6, 12 y 24 horas. El medio DMEM-BFS 10% - gentamicina 150 µg/ml, solo se mantuvo hasta el punto de control correspondiente a las 2 horas, luego se cambio a una concentración 10 veces menor (15 µg/ml) ya que se corre el riesgo de toxicidad.⁽⁴⁷⁾

4.4 Control y recuento de los puntos de control post-infección:

Se procedió para cada punto de control de la siguiente manera: Se aspiró el medio de cada uno de los pocillos de la placa p24 y se lavó 2 veces con PBS 1X. Para obtener las bacterias que se hallan en el espacio intracelular; se lisaron las membranas celulares, agregando 200 µl de triton X100 1X estéril, realizando pipeteos suaves e incubando durante 5 minutos y adicionando luego 300 µl de PBS 1X estéril, se resuspendió y se tomaron 100 µl y se diluyeron con PBS1X (10^{-1} y 10^{-2}). Se tomaron 100 µl de cada una de las diluciones preparadas y se sembraron por triplicado en placas con agar LB o LB con antibiótico según corresponda y se incubaron a 37°C durante 16 horas, realizando el recuento correspondiente.

4.5 Valoración de la capacidad de invasión:

La capacidad de invasión (C_{inv}) de SL1344 en las distintas líneas celulares se calculó dividiendo el número de bacterias intracelulares viables (V_i) a un tiempo corto (2 horas) frente al número de bacterias extracelulares añadidas para infectar las células eucariotas (V_e). A dos horas post infección la bacteria intracelular todavía no ha iniciado el crecimiento. V_e corresponde a 5 µl del cultivo bacteriano crecido durante la noche y por tanto se determina directamente a partir de la titulación de dicho cultivo.

$$C_{inv} = [V_{i(2\text{ Horas})} / V_e] \times 100$$

4.6 Valoración del índice de proliferación intracelular

El índice de proliferación intracelular, I_{pro} , se calculó dividiendo el número de bacterias viables intracelulares a tiempo largo (24 horas) frente al número de bacterias viables intracelulares obtenido a tiempo corto (2 horas)

$$I_{pro} = V_{i(24\text{ horas})} / V_{i(2\text{ horas})}$$

5. Ensayo de Infección empleando el Modelo en ratón ⁽⁶⁹⁾

5.1 Preparación de muestras para inocular ratones por vía oral (Figura N° 07)

Se crecieron las estirpes, como se indica en el punto 2.2. Se tomó 1 ml y se centrifugó a temperatura ambiente por 3 minutos a 14000 r.p.m, descartándose el sobrenadante y se resuspendió en 100 μ l de PBS estéril (valor esperado 10^8 UFC/10 μ l) y se hicieron diluciones seriadas usando PBSIX estéril para obtener 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 UFC/10 μ l. De las diluciones 10^7 , 10^6 y 10^5 UFC/10 μ l se tomaron 75 μ l y se añadieron a 75 μ l de una solución de bicarbonato de sodio 2% + glucosa 0,5% y se inocularon 5 ratones por estirpe. Las diluciones 10^3 , 10^2 y 10 UFC/10 μ l se usaron para realizar el recuento en placa por triplicado, tomando 100 μ l de cada dilución y se plaquearon, incubándose a 37°C por 18 horas.

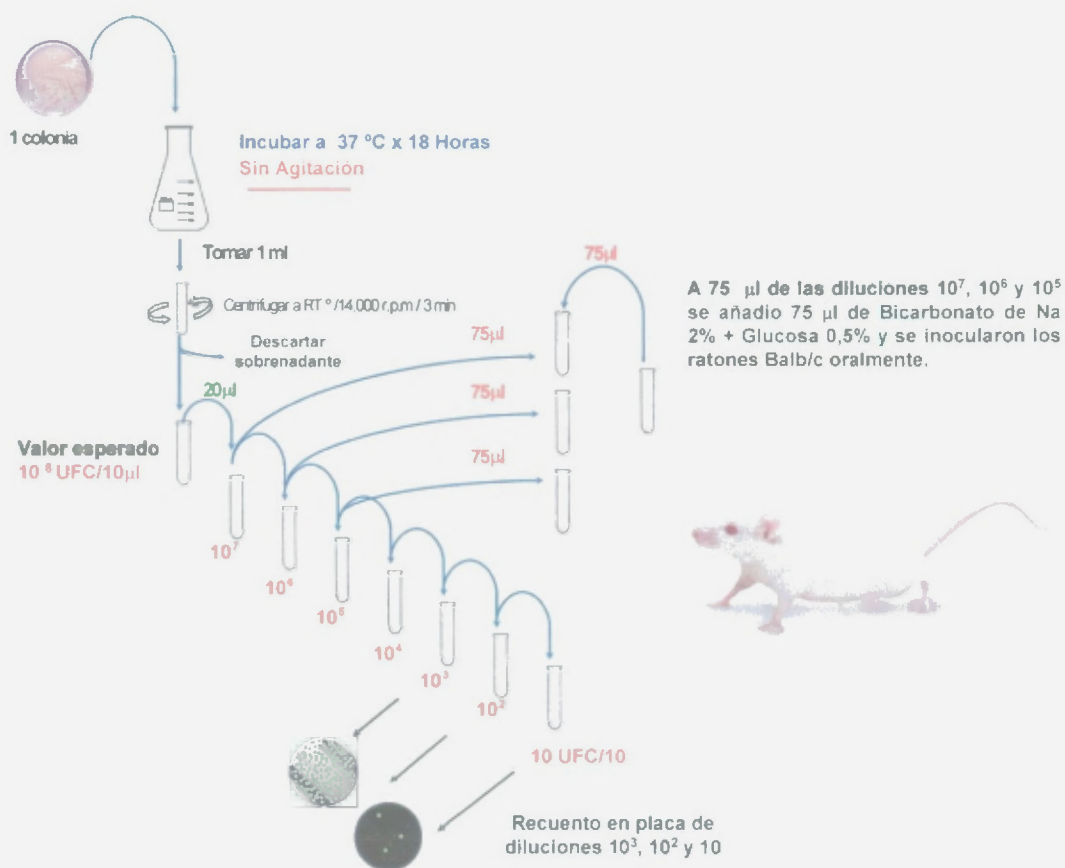


Figura N° 07. Esquema de la preparación de muestras para inocular ratones por vía oral.

Los recuentos de las diluciones de infección utilizadas se realizaron por triplicado. Se recomienda además no reutilizar la mezcla de bicarbonato de sodio y glucosa.

5.2 Recuento de bacterias post- infección en hígado y bazo (Figura N° 08)

Para este análisis se extrajeron estérilmente, el hígado y el bazo de los ratones infectados por SL1344 y mutantes derivados, que murieron durante el ensayo de infección (los que sobrevivieron a la infección, se sacrificaron a la cuarta semana) y fueron puestos en nieve carbónica. Se homogenizaron los órganos estérilmente añadiendo 10 ml de PBS 1X estéril. El valor esperado para el hígado es de 10^9 U.F.C y para el bazo 10^8 U.F.C/10 ml. Se tomaron 100 μ l y se realizaron diluciones seriadas empleando PBS1X estéril hasta obtener 10 U.F.C/100 μ l para ambos órganos. Se plaquearon por triplicado las diluciones 10^3 , 10^2 y 10 U.F.C/100 μ l, y se incubó a 37°C por 18 horas, haciéndose el recuento de UFC. El valor de la dosis letal media (DL_{50}) se calculó según el método descrito por Reed y Muench. ⁽⁶⁵⁾

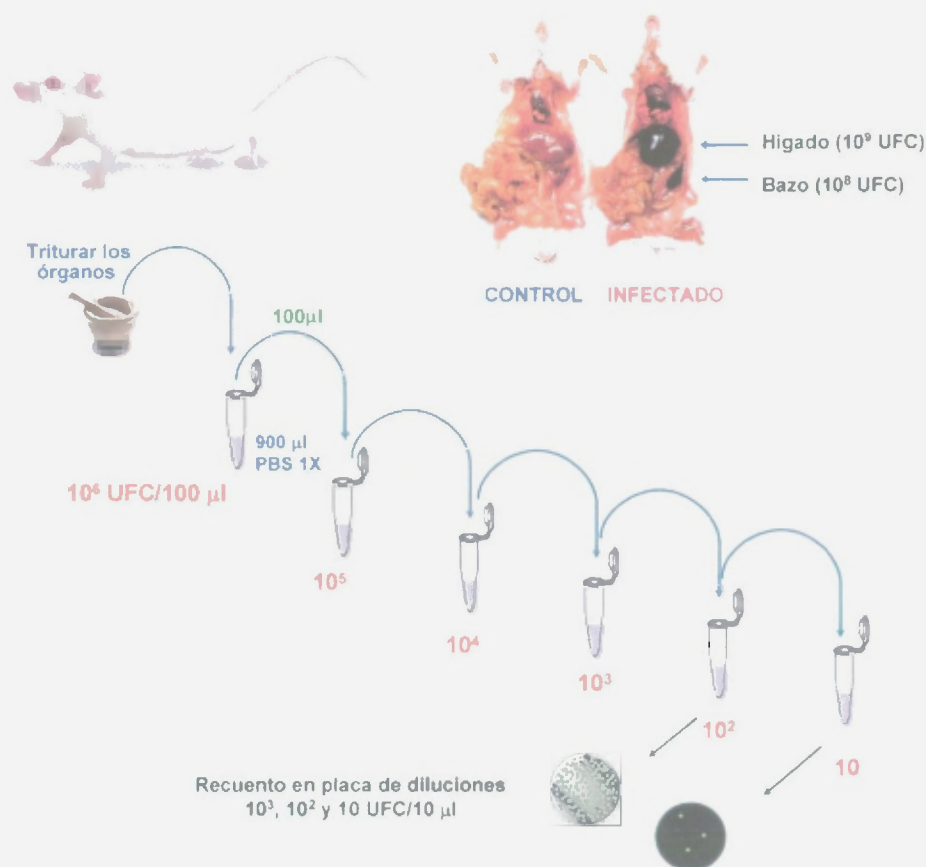


Figura N° 08. Esquema de la técnica de recuento empleada para SL1344 y mutantes derivados de la sustitución e inactivación genética post- infección en hígado y bazo. El recuento en placa de las diluciones provenientes de los órganos homogenizados se realizó por triplicado.

El doble marcaje se realizó agregando 500 µl de anticuerpo α -actina: citoesqueleto (Faloidina Alexa 488 (verde) (1/1000 en PBS1X), durante 45 minutos a temperatura ambiente (protegido de la luz), también puede dejarse 12 horas a 4 °C. Se quitó el anticuerpo por aspiración y se lavó 6 veces con PBS 1X.⁽⁴⁶⁾ Para el triple marcaje se añadieron 500 µl anticuerpo α -núcleo: DAPI (1/1000 en PBS1X)), incubándose 30 minutos a temperatura ambiente (protegido de la luz), se retiró por aspiración y se lavó 3 veces con PBG, luego 3 veces con PBS y finalmente 10 veces con agua miliQ.

Los cubreobjetos marcados se colocaron sobre una gota de medio de montaje (prolon o moviol (Sigma)) en un portaobjetos, sellándose con laca de uñas transparente. La observación microscópica se realizó con microscopio de barrido láser confocal LSM510 META con un objetivo 63X/1.40 oil Plan-Apochromat, usando láser argón (457/476/488/514 nm), Helio Neón (543 nm) y diodo rojo (683 nm) y las imágenes se obtuvieron con la ayuda del programa LaserSharp 2000 v.4 y una distancia óptima entre planos de 0,12 µ para realizar la deconvolución usando el programa Huygens System 2.4.1.

7. Microscopia in vivo en campo claro

Se realizaron pre inóculos de las diferentes estirpes de *E. coli* así como SL1344 y mutantes derivados de la inactivación genética, se cogieron 5 µl y se crecieron en una lamina portaobjetos excavada conteniendo agar LB (suplementado con el antibiótico correspondiente, en dependencia del mutante a ensayar), se dejó secar durante 10 minutos y se colocó un cubreobjetos para su visualización en el FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Este equipo permite la observación directa in vivo, está compuesto por microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara CCD monocroma C9100-02 (Hamamatsu) y cambio ultrarrápido de filtros, usándose objetivo 63X/1.4 oil Plan-Apochromat Ph3 en campo claro. Este equipo cuenta con controlador de temperatura, CO₂, humedad e incubador de manera que permitió las condiciones apropiadas de crecimiento realizándose la captura de las imágenes cada 60 segundos (en diferentes planos de profundidad) con la ayuda del programa Metamorph 6.1r6 (Universal Imaging).

8. Clonaje, expresión, purificación y determinación de la actividad enzimática de PBP4B de *E. coli* y *MraW* de *Lactococcus lactis* MG-8 y SL1344.

8.1 Amplificación por PCR :

Se amplificó el gen *mraW*, usando como molde bien el vector pCR2.1- *mraW* de *Lactococcus lactis* MG-8, o el ADN genómico de SL1344 y los cebadores NdeI-LL-MraW-F2 y HindIII-LL-MraW-R2, que generan sitios de cortes NdeI y HindIII flanqueantes. Para *pbp4b*, se usó el ADN genómico de CS-109 como molde y los cebadores NheI-PBP4B y Hind III-PBP4B.

8.2 Obtención de los genes *mraW* y *pbp4b* con extremos cohesivos

Los productos de PCR, se ligaron al vector pCR2.1 (según especificaciones del fabricante). los productos de la ligación se transformaron por choque térmico a 42°C por 2 min. en células competentes INVαF', seleccionándose en placas de agar LB suplementados con kanamicina 30 µg/ml y XGAL 40 µg/ml, eligiendo tras incubación a 37°C, las colonias blancas, que fueron verificadas por minipreps (Promega) y digestión por las enzimas de restricción flanqueantes a cada gen a fin de liberar los genes *mraW* y *pbp4b* con extremos cohesivos.

8.3 Construcción del vector pET28b conteniendo los genes *mraW* y *pbp4b*

Se digirió el vector pET28b con las enzimas de restricción flanqueantes a cada gen y se realizó un ensayo de ligación usando la T4 DNA ligasa a 16 °C por 12 horas. Este producto se transformó en células competentes DH5α, seleccionándose los clones resistentes a kanamicina, verificándose por el tamaño del plasmido y digestión doble con las enzimas de restricción flanqueantes a los genes. Luego se transformaron las construcciones pET28b-MraW-MG8 y pET28b-PBP4B en la estirpe BL21 (DE3) (que presenta el gen codificante para la T7 RNA polimerasa bajo control operon *lac*).

8.4 Expresión y purificación de las proteínas *MraW* y *PBP4B*.

Se crecieron los clones de BL21 (DE3)/ pET28b-MraW-MG8 y PBP4B a 37 °C durante 12 horas en caldo LB kanamicina 30 µg/ml. Se diluyó 1/100, incubándose a 37°C hasta D.O_{600 nm}: 0,3, dividiéndose en dos matraces y se indujo uno de ellos con IPTG 1mM siendo el otro el control.

Se incubo a 37°C hasta D.O_{600 nm}: 1. Se centrifugo a 10,000 rpm a 4 °C durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 2 ml de buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 10 mM de Imidazol, ajustado a pH 8 con NaOH), sonicando por 5 pulsos a máxima amplitud por 30 seg. con intervalos de 1 minuto entre pulsos. Luego se centrifugo a 7000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se colecto el sobrenadante (extracto total) y se mantuvo a -20°C. En el caso de PBP4B, al ser proteína de membrana, el extracto total se ultracentrifugó a 80000 rpm a 4°C durante 30 min., se colecto el pellet (extracto de membranas) se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis, manteniéndose a -20°C.

Dado que el clonaje de los genes *mraW* y *pbp4b* en pET28b, le añade a las proteínas una cola de 6 histidinas en la porción amino terminal, se usara la capacidad de unión de esta al níquel, usando una columna de resina Ni-NTA (Invitrogen) para purificarlas según especificaciones del fabricante. Las fracciones purificadas por Ni-NTA, se dializaron y se liofilizaron. Se corrió un gel de SDS-PAGE al 10% con las proteínas purificadas a fin de determinar su pureza y su concentración se determino por ensayos de BSA. Se realizo un western-blot para verificar la presencia de las proteínas purificadas usando anticuerpos antiHis.

8.5 Cross-Linking con rayos U.V y unión de S-adenosil-L-metionina de la proteína *MraW*.

Para el ensayo de fijación de SAM se utilizo un volumen de reacción de 20 µl, conteniendo 10 µl de *MraW* Purificada (0,03 µg/ µl), 5 µl S-Adenosyl-L-[methyl-³H] Methionine 1 µCi / µl, de Amersham [12,8 µM] (concentración final 2,6 µM) y 5 µl Buffer 4X (400 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl, pH: 8, 8 mM EDTA, 4 mM β-Mercaptoetanol).

Se uso el GS Gene Linker UV Chamber BIO-RAD a 250 mJoule para realizar el cross-linking a tiempos de irradiación de 0, 5, 10, 15 y 20 minutos a 4°C, luego se agregaron 5 µl de buffer de carga de proteínas 5X, se corrió todo el volumen de reacción en un gel de SDS-PAGE al 10%, luego se fijo el gel en 30 ml de ácido acético 7% durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se equilibrio en 30 ml agua durante 30 minutos (2 veces), seguidamente se impregno en 37 ml salicilato sódico 16% y etanol 40% durante 1 hora. El salicilato sódico, es un fluoróforo que amplifica la señal radioactiva. Se utiliza una solución nueva en cada ensayo. El gel se seco durante 2 horas en gel dryer de BioRad y finalmente se expuso frente a una película durante 3-4 días a 20°C.

8.6 Ensayo de la actividad metiltransferasa de MraW:

El ensayo de actividad metiltransferasa mediada por SAM se llevo a cabo en 20 μ l de reacción conteniendo 15 μ l de Muestra (este volumen vario al ensayarse diferentes concentraciones y fuentes de proteína MraW (purificada, extracto total, membranas enriquecidas con PBP3), 5 μ l S-Adenosyl-L-[methyl-3H] Methionine [12,8 μ M] (concentración final 2,6 μ M) y 15 μ l buffer citrato sódico 0,1 M pH 6,0. Se incubo durante 30 minutos a 37°C, luego se agregaron 10 μ l de buffer de carga de proteínas 5X, se corrió todo el volumen de reacción en un gel de SDS-PAGE al 10%, el tratamiento de impregnación por salicilato sodico y exposición se realizo de manera similar a lo detallado en el punto 8.5.

8.7 Determinación de actividad DD-carboxipeptidasa en PBP4B usando como sustrato el M5 o disacárido - pentapéptido (NAcGlu-NAcMur-L-ala-D-glu-m-DAP-D-ala-D-ala)

Se utilizo buffer de reacción conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 7, 0,2 mM ditiotreitól , 5 mM $MgCl_2$, 0,5 % Polietilenglicol 8000, 10 % dimetilsulfoxido y se añadieron 25 μ l de PBP4B 25 nM (25 femtomoles/ μ l) y 10 μ l de M5 desalado (proviene de la purificación a través de HPLC del PG del mutante DV-900). Luego de incubación, se inyecto el volumen de la reacción para separase por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para determinar alguna variación en el sustrato empleado en la reacción por acción de PBP4B.

8.8 Ensayo para determinar actividad DD-Carboxipeptidasa en PBP4B usando como sustrato el Tripéptido N α , N ϵ - Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala.

El método enzimático para estimar la D-Ala liberada por acción de actividad DD-carboxipeptidasa, es una modificación del método de Ghuysen ⁽⁵⁹⁾, (permite varios ensayos simultáneos en tiempos muy cortos). Se emplearon los siguientes reactivos stock: o-Dianisidine SIGMA: 10 mg / ml en metanol, FAD (Flavin Adenine Dinucleotide Disodium Salt SIGMA): 0,3 mg/ml en buffer pirofosfato de K, Peroxidasa SIGMA: Diluida 1/1000 en agua, D-aminoácido oxidasa: 20.7 U/mg (11,9 mg/ml) , mezcla de enzimas /coenzimas (preparado nuevo para cada uso), buffer pirofosfato de potasio, 0,1 M, pH 8,3 / FAD / Peroxidasa / D-aminoácido oxidasa (20:10:5:1, v/v/v/v)).

Se realizó el ensayo en un volumen de reacción de 30 μ l, conteniendo 15 μ l Na α , N ϵ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (25 mM), 3 μ l Buffer 10X (Buffer Tris-HCl 300 mM pH 7,5 + 12 μ l PBP4B). Se incubó a 37 °C, realizando controles cada 10 minutos durante 1 hora, se añadieron 5 μ l o-Dianisidina y 70 μ l de mezcla de enzima/coenzimas, incubándose 5 min. /37°C, luego se añadieron 400 μ l de metanol-agua (v/v), se incubó durante 2 minutos a 37 °C y se realizaron lecturas inmediatamente a 460 nm en espectrofotómetro. Se realizaron blancos de la reacción, conteniendo solo PBP4B y también controles de degradación del tripéptido, para cada uno de los puntos de control.

8.9 Ensayo de unión a Bocillin-FL en PBP4B

Este método emplea una penicilina fluorescente, como reactivo de marcaje para la detección de las PBPs, permite la detección rápida por fluorescencia, de 30 ng de PBP purificada y 2 a 4 ng si se emplea el Typhoon⁽⁸⁷⁾. Se obtuvieron membranas por ultracentrifugación, usándose medio M9 a 21 °C e inducción a 1 mM IPTG por 12 horas en agitación constante.

El volumen de la reacción usado fue de 50 μ l, conteniendo 30 μ g membranas BL21(DE3)/pET28b-PBP4B no inducidas (5,2 mg/ml) e inducidas por IPTG (5,1 mg/ml), 40 μ l buffer fosfato 50 mM pH 8 y 5 μ l Bocillin-FL 50 μ M ([final]5 μ M)). Se realizó una incubación previa de 30 minutos a 37 °C, para el ensayo de competición por ampicilina 100 μ g/ml, luego se añadió Bocillin-FL y se incubó por otros 30 minutos a 37 °C, finalizada la incubación, se añadieron 10 μ l de buffer de carga de proteínas 5X y se cargó en gel SDS-PAGE 10% y se reveló usando el Typhoon 9200 (General Electric) usando la longitud de onda de excitación (488 nm) y de filtros de emisión (520 nm) recomendado para este fluoróforo.

8.10 Extracción del Peptidoglicano

Este protocolo está basado en el trabajo de Glauner et al.⁽²⁷⁾, para ello se seleccionó 1 colonia y se sembró en 10 ml de caldo LB (suplementado con el antibiótico que corresponda), se incubó a 37 °C durante 12 horas en agitación constante. Se inocularon 2,5 ml de este cultivo en 250 ml de medio precalentado a 37 °C, y se incubó a 37 °C en agitación constante hasta D.O 600 nm 0,7 – 0,9. Se centrifugó a 4° C a 10,000 r.p.m durante 15 minutos, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 3 ml de agua Mili Q. Se añadió gota a gota en 6 ml SDS 6% hirviendo y se mantuvo durante 2 horas en agitación (luego 65 ° C durante 12 horas sin agitación) o se hirvió durante 4 horas en agitación (luego temperatura ambiente durante 12 horas en agitación suave). Se tomaron 3 ml y se ultracentrifugó a 80,000 rpm a 30 ° C durante 10 minutos, y se descartó el sobrenadante por aspiración.

El pellet de PG se resuspendió en 3 ml de agua miliQ caliente 3 veces o hasta que no se aprecie formación de espuma (eliminación del SDS), ultracentrifugando en TL100 a 80,000 rpm durante 10 minutos a 30°C, resuspendiéndose finalmente en 2 ml Tris-HCl 10 mM pH 7,5, para su digestión con α -amilasa 100 μ g/ml a 37°C durante 90 minutos. Seguidamente, se digirió con pronasa-E 100 μ g/ml a 60°C durante 1 hora (previa activación durante 30 minutos a 60 °C). Finalizada la digestión, se detuvo la reacción añadiendo SDS de manera que quedase al 2% y se hirvió por 1 hora y se lavo 3 veces como se describió anteriormente y se resuspendió en 200 μ l buffer fosfato 50 mM pH 4,9, añadiendo 20-40 μ g/ml de N-O-diacetil muramidasa, digiriendo a 37 °C durante toda la noche.

Se detuvo la reacción hirviendo durante 20 minutos y se centrifugo a 12,000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos, descartando el pellet. Se agrego borato 0,5 M pH 9 a concentración final 0,1M e inmediatamente se paso a tubo pirex conteniendo borohidruro de sodio 8 mg /ml muestra (aprox.1,55 mg) y se dejo reducir durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se neutralizo con ácido ortofosfórico 0,6 M hasta ajustar el pH de las muestras a 3-4 (usando papeles indicadores de pH), finalmente se filtraron usando filtros Millipore (SJHV 0,45 μ M) para eliminar impurezas y se mantuvieron a - 20 ° C

8.11 Análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de la composición en muropéptidos del peptidoglicano.

Para el análisis de muropéptidos por HPLC, se uso el método descrito por Glauner ⁽²⁸⁾. Se preparo buffer A (buffer fosfato 50 mM pH 4,35 con 0,005% de azida sódica, buffer B (buffer fosfato 75 mM pH 4,95 con 15% de metanol (v/v) y buffer C (metanol 60%). Se utilizo un sistema de bombeo Kontron Instruments 325 System, conectado a un detector Jasco UV-1570, columna (tecnokroma) de fase reversa Hypersil ODS 3 μ m de tamaño de partícula con 25/0,46 de dimensiones.

El sistema de detección esta basado en la medición de la absorbancia del eluido a 204 nm. El flujo de los eluyentes fue a 0,5 ml/min. y con una temperatura de la columna de 35 °C. La elución de los muropéptidos se realizo en tres etapas: 1) 7 minutos en buffer A, 2) un gradiente lineal de 90 minutos en buffer B y 3) elución isocrática de 30 minutos en buffer B. Los cromatogramas se analizaron con el programa Biocrom 2000 v.3.0, para el análisis de integración de las áreas correspondientes a cada uno de los picos generados.

9. Clonaje de PBP4bB y AmpC en pK18 y transformación en CS-109, CS-802-2 y DV-900 para determinación de actividad β -lactamasa usando Nitrocefín.

A fin de determinar la actividad β -lactamasa de estas proteínas, se realizó el clonaje de los genes codificantes para PBP4B y AmpC en el vector pK18. La fuente del gen *ampC* proviene de pBGMHN1 (vector derivado de pBGS18 conteniendo el gen *AmpC* de *Enterobacter cloacae* MHN1, realizado por el grupo del Hospital Ramón y Cajal) y debido a que presenta resistencia a ampicilina y esto no nos permitiría realizar el ensayo de determinación de la actividad β -lactamasa, se realizó el clonaje en pK18, vector que presenta el gen de resistencia a ampicilina interrumpido por el gen de resistencia a kanamicina y un promotor inducible por IPTG.

La estrategia de clonaje empleada fue liberar el gen *ampC* por digestión de pBGMHN1 con Eco RI y Hind III, y luego ligarlo a pK18 (previamente digerido con las mismas enzimas). En el caso de *pbp4b*, se empleó la construcción generada en el apartado 8.3, liberando el gen de interés por digestión con XbaI / Hind III para luego ligarlo a pK18. Estas nuevas construcciones, se verificaron por digestión con las enzimas empleadas en el clonaje y por secuenciación y se realizó la transformación por electroporación en las estirpes CS-109, CS-802-2 y DV-900.

El ensayo de determinación de actividad β -lactamasa, se realizó preparando un inóculo de los transformantes conteniendo el pK18-PBP4B y pK18-AmpC en caldo LB suplementado con kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$ y crecidos durante 12 horas a 37 °C, luego se añadieron 100 μl de estos cultivos crecidos en matraces conteniendo 10 ml de LB suplementado con kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37°C hasta un valor de densidad óptica a 600 nm de 0,3 – 0,4 y se realizó la inducción usando IPTG 1 mM y se incubó a 37°C durante 40 minutos (D.O. 600 nm: 0,8-1). De estos cultivos se tomaron 10 μl y se añadieron a 500 μl de Buffer Fosfato 50 mM pH 7 + 20 μl Nitrocefín 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ y se incubó durante 30 minutos a 30 °C, inmediatamente después se realizó la lectura en espectrofotómetro a 486 nm.^{(64) (7)}.

10. Sustitución y eliminación de *mraW* en SL1344/pBAD33-*mraW*.

A fin de determinar de manera apropiada la no esencialidad del gen *mraW*, se clono el gen *mraW* de SL1344 (liberado por digestión XbaI/HindIII del plasmido pET28b-*mraW*) en el vector pBAD33, (presenta el promotor P_{BAD} del operon *araBAD* y el regulador positivo y negativo, *araC* (en presencia de arabinosa, se activa la transcripción del promotor P_{BAD} y en ausencia, esto ocurre a un nivel muy bajo, que puede incluso ser mas reducido si se añade glucosa, que reduce los niveles de AMP cíclico)), permitiéndonos examinar el fenotipo de los mutantes generados bajo condiciones de crecimiento que minimicen la alteración en la morfología celular.

El gen digerido por XbaI/HindIII fue ligado (usando Ligasa T4) al vector pBAD33 (también digerido por XbaI/HindIII), generándose la construcción pBAD33-*mraW*, usada para transformar células competentes DH5 α para su amplificación y verificación por restricción con las enzimas XbaI/HindIII. Una vez realizada la verificación, se transformó en células competentes SL1344, seleccionándose los transformantes resistentes a cloranfenicol, que serán empleados para realizar la sustitución y eliminación de *mraW*.

La estrategia de sustitución e inactivación empleada es la misma descrita anteriormente para el caso de los genes *pbp4b*, *mraZ* y *mraW*, salvo que se realizo siempre en presencia de L-arabinosa 1%, a fin de contar de manera continua con la expresión de *mraW*.

Dado que la expresión o represión del gen *mraW* en pBAD33 esta controlada por la presencia de arabinosa o glucosa respectivamente, se realizaron controles a fin determinar las concentraciones máximas y mínimas que permiten la correcta expresión o represión del gen *mraW*, para ello se crecieron los mutantes obtenidos y se extrajeron las proteínas totales en las diferentes condiciones ensayadas (1, 0,5, 0,25, 0,12 y 0,06% de glucosa y arabinosa) y se corrieron en gel SDS-PAGE 10% y se realizo tinción de Coomassie-Blue y también Western-Blot usando anticuerpos anti histidina.

Una vez verificados los mutantes, se hicieron crecer en presencia de glucosa 1% y se elimino la arabinosa, mostrándonos el crecimiento o no de los cultivos la esencialidad de *mraW*.

11. Análisis del efecto de la sobreexpresión de MurF

A partir del vector pMLD116K (generado por el grupo de investigación del Dr. Dominique Menguin-Lecreux de la universidad de Paris-Sud) que presenta el gen codificante para MurF de *E. coli* bajo el control del promotor TRC, que es un promotor fuerte inducible por IPTG, además presenta el gen de resistencia a kanamicina interrumpiendo el gen de resistencia a ampicilina, se realizó la transformación por electroporación en células electrocompetentes CS-109 y DV-900, seleccionándose los transformantes resistentes a kanamicina y se verificó el correcto tamaño del vector (5,5 Kbp), por minipreps y por restricción con Hind III.

Una vez verificado la correcta transformación de pMLD116K en CS-109 y DV-900, se realizaron curvas de crecimiento en medio LB y M9 suplementados con kanamicina 30 µg/ml a 21°C y 37 °C bajo condiciones de no inducción e inducción por IPTG 1mM final, realizándose las mediciones a D.O_{600 nm}. A partir de estos cultivos se analizó la expresión de MurF a partir del extracto total (las condiciones de ruptura celular fue por sonicación a 4°C con 5 pulsos de 30 segundos a máxima amplitud) y se visualizaron en gel de SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie Blue, otro ensayo realizado fue la extracción del PG y su análisis por HPLC a fin de determinar las variaciones en la composición de muropeptidos bajo las diferentes condiciones de cultivo empleadas.

Los ensayos para realizar la medición de la actividad específica de MurF en los extractos totales obtenidos se realizaron empleando un volumen total de mezcla de reacción de 50µl, conteniendo: 100 mM Tris-HCL pH 8.6, 5 mM ATP, 100 mM MgCl₂, 75 µM D-Ala-D-Ala, 85 µM UDP-MurNAc-[¹⁴C] tripéptido y 15 µl de la dilución apropiada de extracto total de proteína en buffer A (el extracto total fue dializado durante 18 horas en 400 volúmenes de buffer A que contenía buffer fosfato de potasio 20 mM pH 7.4, 0.3 mM MgCl₂ y 1 mM 2-mercaptoetanol y luego cuantificada por Bradford). Se incubó durante 30 minutos a 37 °C y se detuvo la reacción añadiendo ácido acético, luego se liofilizó y el sustrato radioactivo y el producto de la reacción fueron separados por HPLC y cuantificado.

12. Sustitución y eliminación del gen *gidB*.

Se realizó la sustitución y eliminación del gen *gidB* (glucose-inhibited división protein **B**, el cual presenta una actividad putativa similar a la actividad que sospechamos presenta *mraW* (probable metiltransferasa dependiente de S-Adenosil Metionina (SAM), específico para sustrato esteroide y/o lípido) en un contexto genético en el cual se encuentra eliminado este gen (SL1344 $\Delta mraZW$) y como control se empleó la cepa silvestre SL1344.

La estrategia empleada para lograr este objetivo, fue similar a la misma descrita anteriormente en el apartado 2. Los mutantes obtenidos fueron caracterizados de manera similar a lo señalado para los mutantes de *mraZ* y *mraW*.

RESULTADOS

En el presente capítulo se presentan los resultados de la investigación, los cuales se organizan en tres secciones: la primera se refiere a los resultados de la investigación, la segunda a los resultados de la investigación y la tercera a los resultados de la investigación.

1. Sustitución e inactivación genética en *E. coli* y SL1344 del gen codificante para PBP4B.

A través de búsqueda por homología de secuencia en el genoma de *E. coli*, se identificó una putativa PBP, denominada 4B, homóloga a AmpH (otra PBP identificada in-silico). PBP4B pertenece al cluster de genes homólogos COG1680, donde se localizan las proteínas de diferentes organismos con actividad β -lactamasa tipo-ampC y DD-carboxipeptidasa (CPasa).

Estirpe ^a	Gen ^b	Contexto Genómico ^c
<i>E. coli</i> K12	b2430	zipA, 17, pbp4B , 4, amiA, 36, dapE, 5, dapA
<i>E. coli</i> O157:H7	Ecs3301	zipA, 16, pbp4B , 4, amiA, 27, dapE, 5, dapA
<i>E. coli</i> O157:H7 EDL933	Z3695	zipA, 16, pbp4B , 4, amiA, 27, dapE, 6, dapA
<i>S. Typhimurium</i> LT2	STM2478	zipA, 21, amiA, 27, pbp4B , 4, dapE, 5, dapA
<i>S. Typhi</i> Ty2	t0381	zipA, 20, amiA, 26, pbp4B , 4, dapE, 5, dapA
<i>S. Typhi</i> CT18	STY2716	zipA, 20, amiA, 26, pbp4B , 4, dapE, 5, dapA
<i>S. flexneri</i> 2a 301	fragment	zipA, 16, Δ , 4, amiA, 25, dapE, 6, dapA
<i>S. flexneri</i> 2a 2457T	fragment	zipA, 16, Δ , 4, amiA, 23, dapE, 5, dapA
<i>E. coli</i> UPEC CFT073	fragment	zipA, 16, Δ , 6, amiA, 29, dapE, 6, dapA

Tabla N° 11. Contexto genético del gen *pbp4b* en especies de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*.

^a especie de Enterobacteria con la totalidad del genoma secuenciado, ^b Nombre del gen *pbp4b* en cada uno de los genomas completos, ^c Los números flanqueando los nombres de los genes se corresponden con el número de genes identificados entre ellos, Δ fragmento del gen.

Se amplificaron los genes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol por PCR, los parámetros de amplificación, variaron en función de la pareja de cebadores usados (Eco-4b-H1P1, Eco-4b-H2P2, Eco-4b-H2P1, Eco-4b-H1P2, STM-4b-H1P1, STM-4b-H2P2, STM-H2P1, STM-4b-H1P2), ya que la temperatura de melting (T_m) teórica señalada para los cebadores descritos estaba indicada como $>75^\circ\text{C}$, siendo necesario en algunos casos realizar 10 ciclos previos de amplificación a una T_m mas baja (cercana a la T_m de la región P1 o P2) y así favorecer la hibridación de la región codificante en los primeros ciclos y luego incrementar la temperatura a 70°C como máximo, haciendo de esta manera mas restrictiva la reacción de amplificación.

La figura N° 09, muestra la verificación de los tamaños de los fragmentos conteniendo los genes flanqueados por los sitios H1 y H2 para el gen *pbp4b* generados por PCR, Los valores esperados para el gen de resistencia a kanamicina es de 1,6 Kb. y para cloranfenicol es de 1,1 Kb, coincidiendo los resultados obtenidos con los valores esperados.

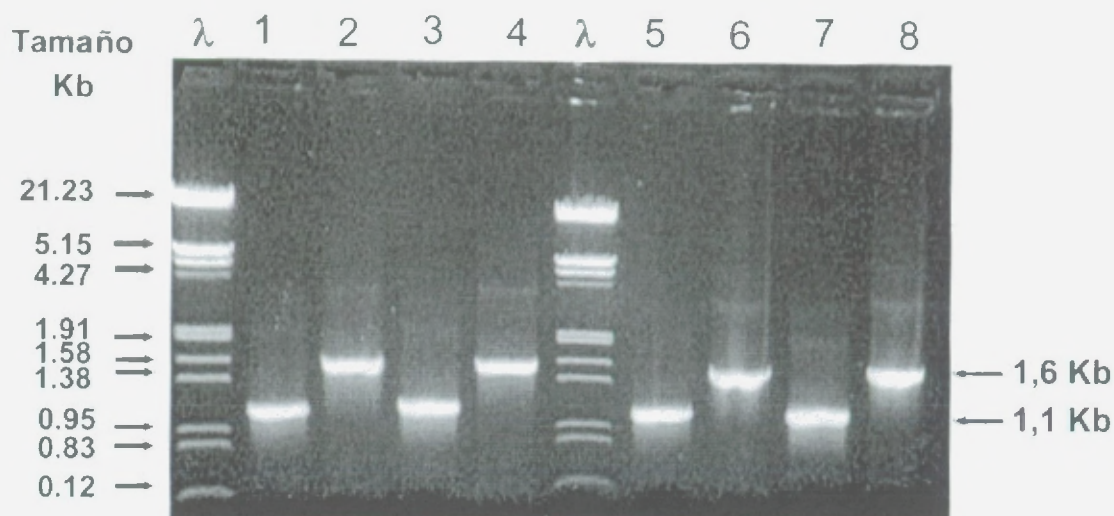


Figura N° 09. Verificación del tamaño de los fragmentos amplificados por PCR.

Usando los plásmidos pKD3 y pKD4 (molde de los genes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol respectivamente, se amplificó el gen de resistencia a cloranfenicol en orientaciones forward (1) y reverse (3) usando los cebadores H1P1/H2P2 y H1P2/H2P1 respectivamente. 2 y 4, corresponden a las orientaciones forward y reverse del gen de resistencia a kanamicina, con los mismos cebadores, para SL1344. Las líneas 5 y 7 son las homologas a 1 y 3, así mismo las líneas 6 y 8 son homologas a 2 y 4 pero en este caso para *E. coli*.

En la técnica empleada por Datsenko⁽⁸¹⁾, se señala la importancia del tratamiento previo con *DpnI* (enzima de restricción que requiere N⁶-metiladenina en la secuencia de reconocimiento y no corta ADN *dam*-) de los genes de resistencia a antibióticos a usarse en la sustitución genética, reduciendo la generación de falsos positivos. Los productos de PCR digeridos por *DpnI* y purificados, se emplearon para transformar por electroporación células competentes de BW25113, RP1 y SL1344 conteniendo el plásmido pKD46 (Recombinasa red del fago λ).

Se obtuvieron como promedio aproximadamente entre 10-100 UFC/ml, y se seleccionaron 2 clones de cada orientación para el caso del gen de resistencia a cloranfenicol y 3 clones en el caso del gen de resistencia a kanamicina, a fin de verificar la correcta sustitución, empleando los cebadores de verificación ForA-Eco, ForB-Eco, RevC-Eco, ForA-STM, ForB-STM y RevC-STM, diseñados para reconocer secuencias externas cercanas a la región genética de *pbp4b* (aproximadamente 50-100 bp.), permitiendo obtener tamaños similares a los obtenidos en la amplificación por PCR de los genes de resistencia (1,6 y 1,1 Kb) indicándonos que la recombinación homologa ha ocurrido en la región apropiada.

Como control de la presencia de *pbp4b*, se emplearon los mismos cebadores de verificación, pero usando como molde el ADN de DH5 α , que nos dará el tamaño correspondiente a *pbp4b* (1,3 Kb). No se muestran los resultados obtenidos para las otras estirpes empleadas (RP1 y SL1344), ya que los resultados son similares al que se muestra en la figura N° 10 para BW25113.

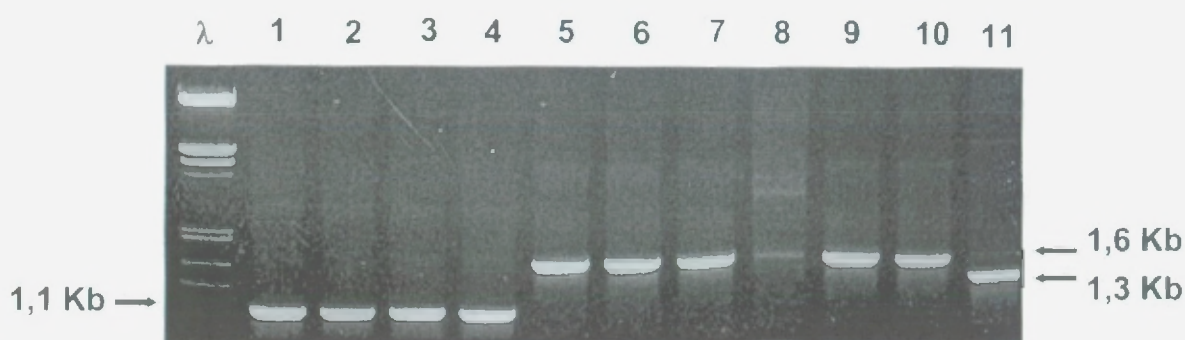


Figura N° 10. Verificación de la correcta sustitución del gen *pbp4b* en BW25113. Se sustituyó *pbp4b* por los genes de resistencia a cloranfenicol (líneas 1 y 2 BW25113CF, 3 y 4 BW25113CR) y kanamicina (líneas 5 a 7 BW25113KF y 8 a 10 BW25113KR). Como control de presencia del gen se utilizó DH5 α (línea 11). Se emplearon los cebadores de verificación indicados en la tabla N°05.

De los mutantes verificados se hizo electrocompetente, el clon BW25113CF N°1 (en el caso de los mutantes de RP1 y SL1344, se realizó la misma selección) para transformarlos con pCP20 y se seleccionaron creciéndolos en agar LB suplementado con ampicilina 100 μ g/ml (resistencia mediada por el pCP20) e incubándolos a 30°C (debido a la termo sensibilidad del vector). La eficiencia de transformación fue similar a la obtenida anteriormente.

Se seleccionaron los transformantes resistentes a ampicilina (el mismo numero de clones que en el ensayo de sustitución) y se verificó la correcta pérdida del gen de resistencia que reemplazaba al gen *pbp4b*, empleando para ello los mismos cebadores de verificación antes descritos. En dependencia de la pareja de cebadores que se empleen, se generaran fragmentos de 0,4 Kb (ForA+RevC) y 0,8 Kb (ForB+RevD) como se puede apreciar en la figura N° 11.

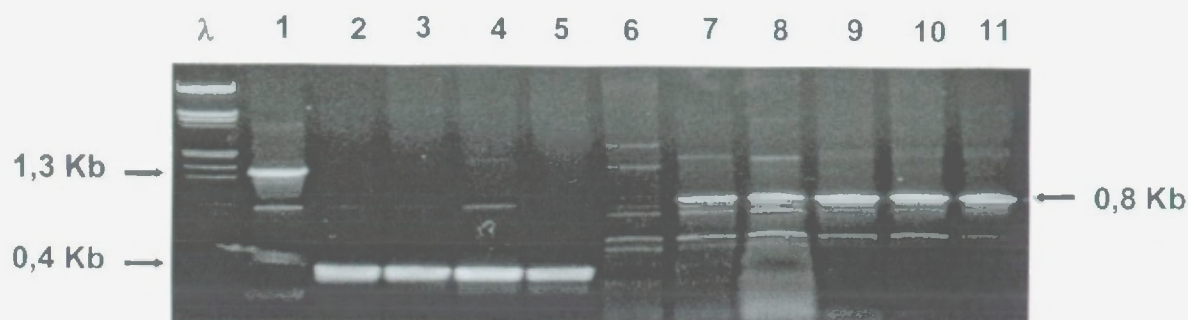


Figura N° 11. Verificación de la eliminación del gen *pbp4b* en BW25113.

Se usaron los cebadores de verificación descritos en el ensayo anterior. La diferencia de tamaño en las bandas se debe a los cebadores empleados: líneas 2-6 (ForA+RevC), líneas 7-11 (ForB+RevC). El control de tamaño corresponde a la amplificación realizada sobre DNA de BW25113 con ForA+RevC (línea 1).

Aun cuando no se muestran los resultados obtenidos para las estirpes RP1 y SL1344, cabe mencionar que se obtuvieron los mismo resultados que los mostrados para BW25113, generándose los mutantes RP1KF, RP1KR, RP1CF, RP1CR y RP1Δ4B, así como SL1344-4b-KF, SL1344CF y SL1344Δ4B.

Los mutantes de SL1344 generados de la sustitución e inactivación del gen *pbp4b*, fueron evaluados a fin de determinar si el efecto de la mutación era capaz de alterar la capacidad de invasión y proliferación intracelular en modelo en ratón y en líneas celulares eucarióticas.

2. Análisis de los mutantes derivados de la sustitución e inactivación de *pbp4b* en SL1344

Se realizaron ensayos en líneas celulares eucarióticas permisivas y no permisivas y en el modelo en ratón, a fin de demostrar la esencialidad o no de este producto genético en el proceso de infección y proliferación intracelular.

Al ser comparados los valores obtenidos de las dosis letal media (DL_{50}) del mutante SL1344 Δ PBP4B con los de la estirpe silvestre SL1344 no mostraron una variación significativa (D_{L50} de 9 días para la dilución de infección 10^7 y 12 días para 10^6 , las diluciones 10^5 no alcanzaban a reducir la población por debajo del 60%), en contraste el mutante SL1344-4b-KF, en el cual la dosis de infección mínima empleada (10^5) no produjo ninguna baja entre los ratones ensayados durante todo el experimento y presentó un valor D_{L50} de 15 días para las diluciones de infección 10^7 y 10^6 (ver figura N° 13)

En células HeLa, Los valores obtenidos para la capacidad de invasión fueron de 0,6 % (SL1344), 0,79 % (SL1344KF) y de 0,51 (SL1344 Δ *pbp4b*) y los valores de índice de proliferación fueron de 1,91 (SL1344), 1,08 (SL1344KF) y de 1,02 (SL1344 Δ *pbp4b*). Cabe mencionar que el tiempo mínimo post infección utilizado para el recuento de las bacterias intracelulares viable fue de 30 minutos, para NRK y 3T3 se usó tiempo de 2 horas.

En células NRK Los valores de capacidad de infección fueron de 4,49% (SL1344), 3,85% (SL1344KF) y 3,07 (SL1344 Δ *pbp4b*) y los valores de índice de proliferación de 0,5 (SL1344), 0,27 (SL1344KF) y 0,36 (SL1344 Δ *pbp4b*).

En células 3T3 Los valores de capacidad de infección fueron de 3,5 % (SL1344), 4,08 % (SL1344KF) y 3,96 (SL1344 Δ *pbp4b*) y los valores de índice de proliferación de 0,76, (SL1344), 0,29 (SL1344KF) y 0,3 (SL1344 Δ *pbp4b*) (ver figura N° 12)

A nivel morfológico, no se apreciaron variaciones significativas entre SL1344 y los mutantes generados, aunque es importante señalar que se apreciaron formas alargadas durante el paso de eliminación del gen de resistencia que reemplazaba el gen de interés al ser transformado por pCP20 y crecido a 30°C, pero estas formas alargadas remitieron a formas semejantes a las de SL1344 al incrementarse la temperatura de cultivo hasta los 42°C, lo cual permitirá la pérdida del vector termosensible pCP20.

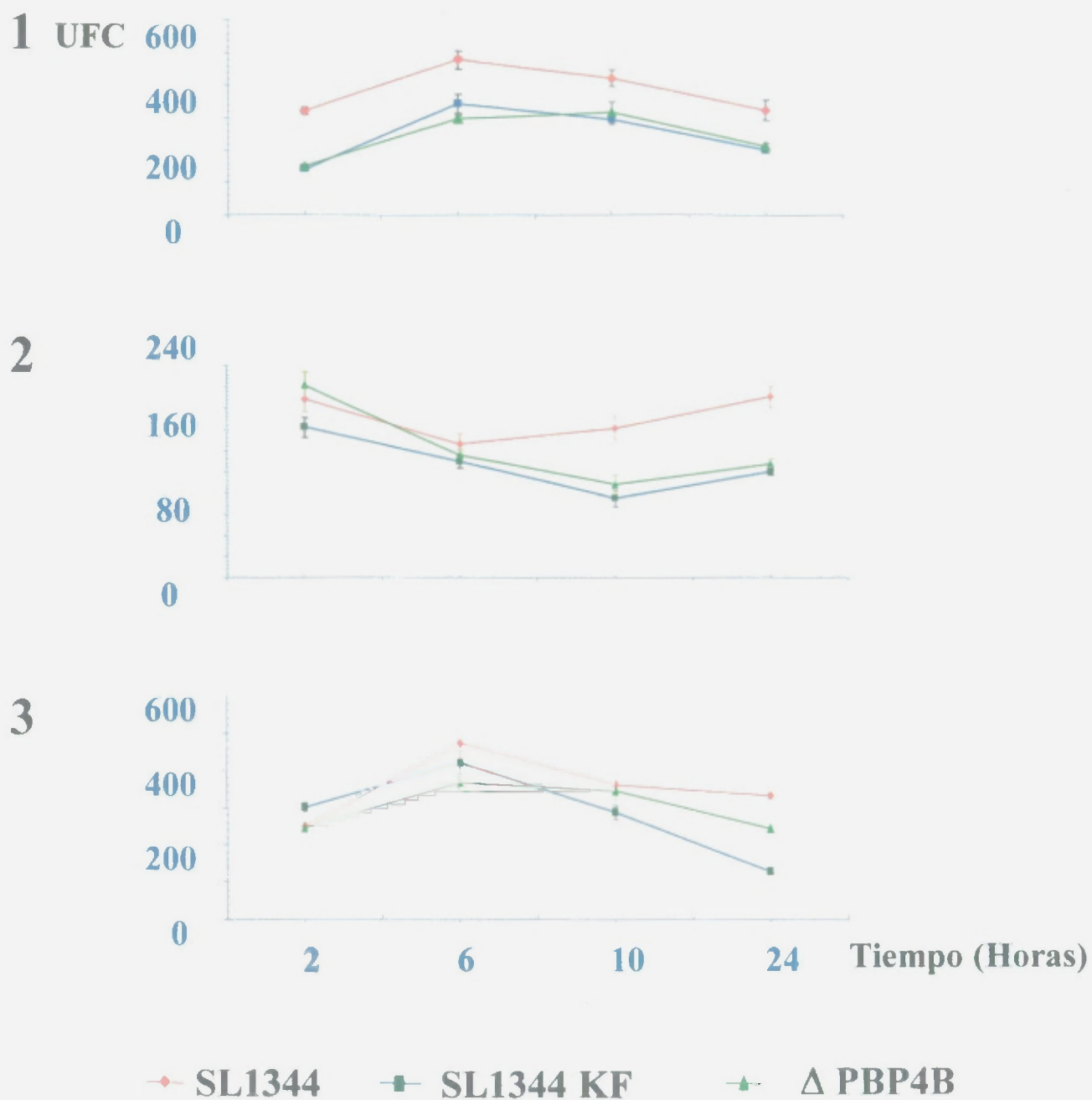


Figura N° 12. Resultados del ensayo de infección y proliferación intracelular en líneas celulares HeLa (1), NRK (2) y NIH/3T3 (3) para las estirpes SL1344, SL1344KF y SL1344 Δ PBP4B respectivamente. Los resultados muestran que la capacidad de invasión y el índice de proliferación intracelular de los mutantes generados son muy similares a los valores observados para SL1344.

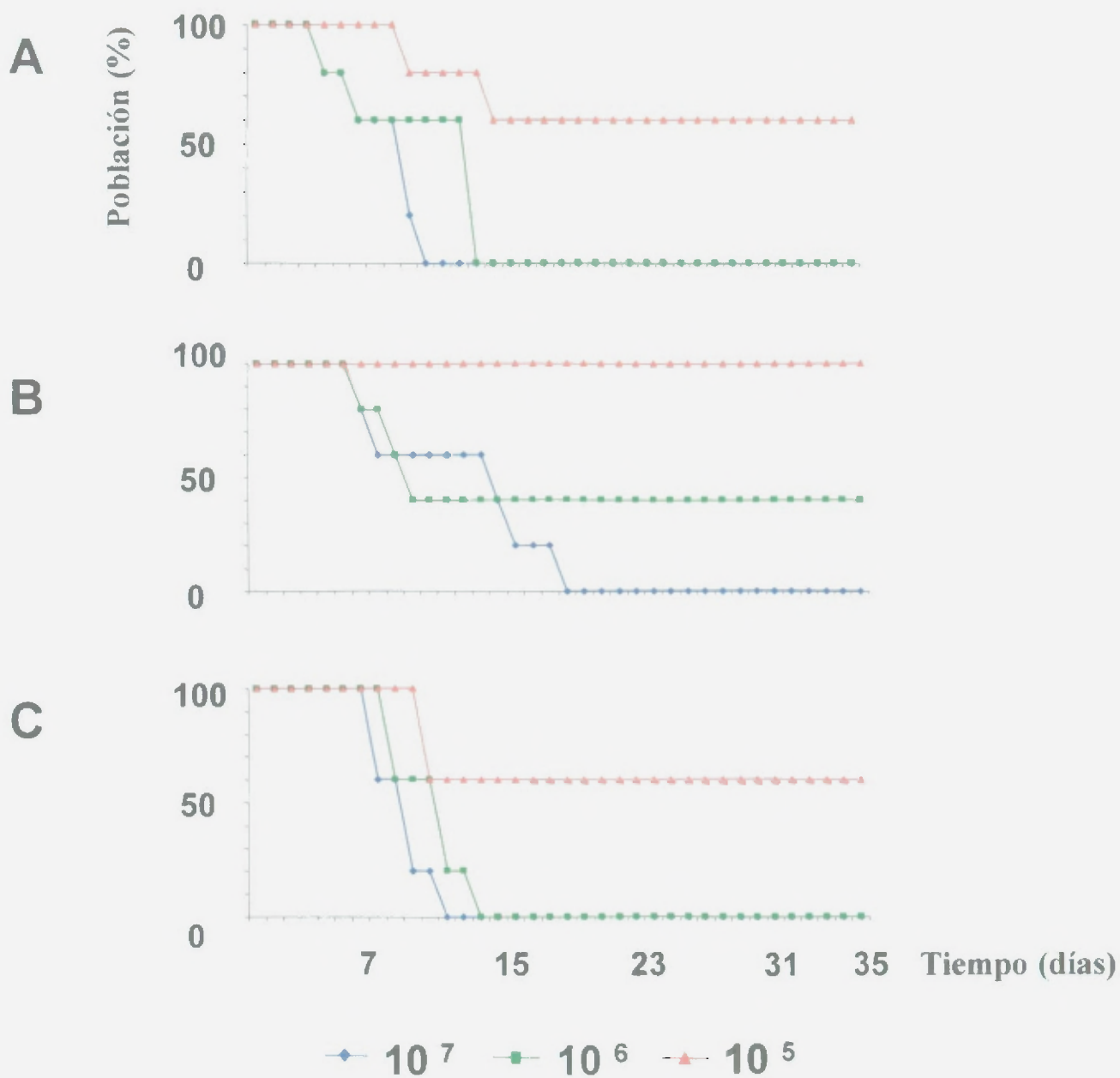


Figura N° 13. Curva de muerte de ratones para el ensayo de infección oral en ratones Balb/c. Se emplearon la estirpe silvestre SL1344 (A) SL1344KF (B) SL1344 Δ PBP4B (C). Los valores de las DL50 comparadas con SL1344 muestran que el mutante SL1344KF es menos virulento.

Se realizaron recuentos en hígado y bazo de los ratones que murieron durante el ensayo de infección, los resultados se corresponden con los valores esperados para cada órgano (10^9 para el hígado) y 10^8 para el bazo.

3. Sustitución y eliminación del gen *pbp4b* en el mutante CS-802-2.

Dado el papel de las PBPs, sintetizando y remodelando el PG y debido a que la bioquímica de estas proteínas esta mejor estudiada en comparación con lo que se conoce de su rol biológico, se pretende entender la función que estas proteínas realizan en la fisiología de *E. coli*.

Usando el mutante CS-802-2⁽¹⁹⁾ (que presenta eliminados 8 genes codificantes para las PBPs: 1b, 4, 5, 6, 7, AmpH, AmpC y DacD) se realizo la sustitución e inactivación del gen *pbp4b*, generándose el mutante DV-900. Se postula que una actividad DD-CPasa pudiera ser esencial para la actividad de PBP2 y 3, por lo tanto indispensable para la viabilidad de la célula. Por ello, y contando con el análisis in silico realizado por nuestro grupo de trabajo, de una nueva PBP denominada 4B (por su homología con PBP4) la cual podría presentar una actividad DD-CPasa y/o β -lactamasa (que sería la ultima actividad DD-CPasa que se conoce en *E. coli*)

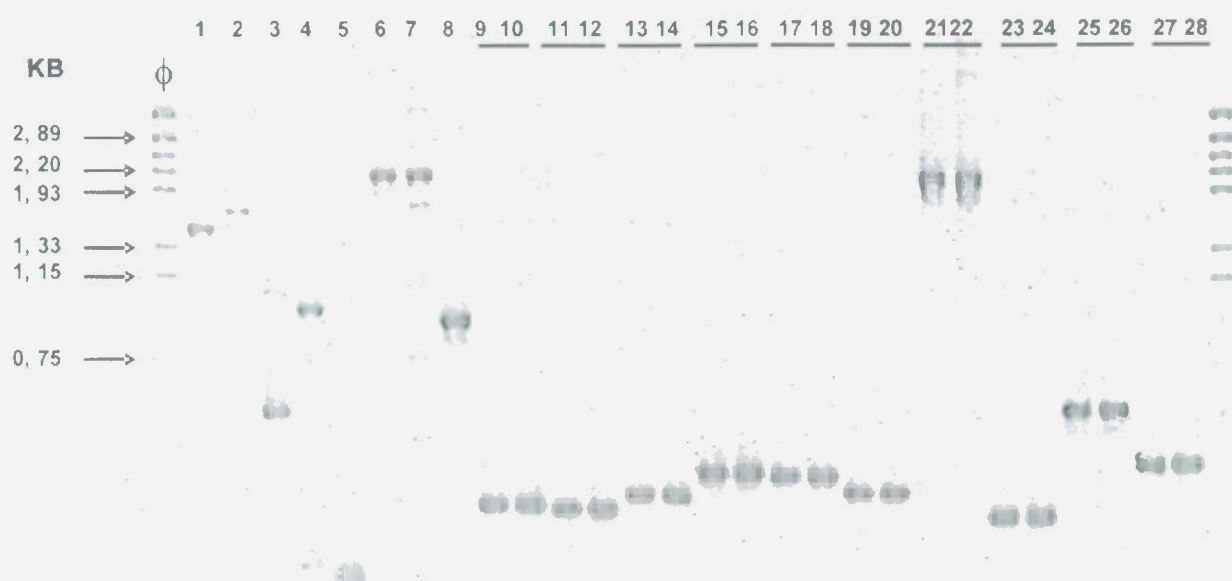


Figura N° 14. Verificación de la sustitución e inactivación del gen *pbp4b* en CS-802-2.

Los tamaños de los fragmentos amplificados se muestran en la tabla N° 04. Las líneas 1 y 6 (CS-802-2), 2 y 7 (DV-900-KF) y 5 8 (DV-900) muestran las diferencias en los productos de amplificación por PCR usando los cebadores ForA-Eco + RevC-Eco y ForB-Eco + RevC-Eco, respectivamente. La línea 3 muestra el producto generado usando los cebadores ForA-Eco + pKD13-K1 en el mutante DV-900-KF. La línea 4 muestra resultados similares obtenido en el mutante DV900-KR usando los cebadores ForA-Eco + pKD13-K2. Las líneas 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25 y 27 corresponden a los genes *dacA*, *dacB*, *dacC*, *dacD*, *ampC*, *ampH*, *ponA*, *ponB*, *mtgA* y *pbpG* en el mutante CS802-2 y las líneas 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 y 28 corresponden a sus homólogos en el mutante DV-900.

4. Caracterización de DV-900

Realizada la verificación de la correcta sustitución e inactivación de *pbp4b* y de que el entorno genético sobre el cual se obtuvo el mutante DV-900, no había sido alterado, se determinaron los tiempos de generación, para ello se hizo una curva de crecimiento en caldo LB (CS-109, CS-802-2 y DV-900) y LB kanamicina 30 µg/ml (DV-900KF y KR) a 37 °C, obteniéndose resultados muy similares entre CS-109, CS-802-2 y DV-900 (22, 24 y 22 minutos respectivamente) pero los mutantes DV-900KF y KR mostraron tiempos de generación un poco mas elevados (28,3 y 35 minutos respectivamente), así como una fase lag mas extendida.

Entre estos dos mutantes, DV-900KF, presento lisis celular al inicio del crecimiento, pero luego creció de manera similar a DV-900KR, quizás estos resultados se deban a un efecto polar de la expresión del promotor del gen de resistencia a kanamicina que altera de alguna manera la normal expresión de los genes downstream en el entorno genético, (figura N° 15).

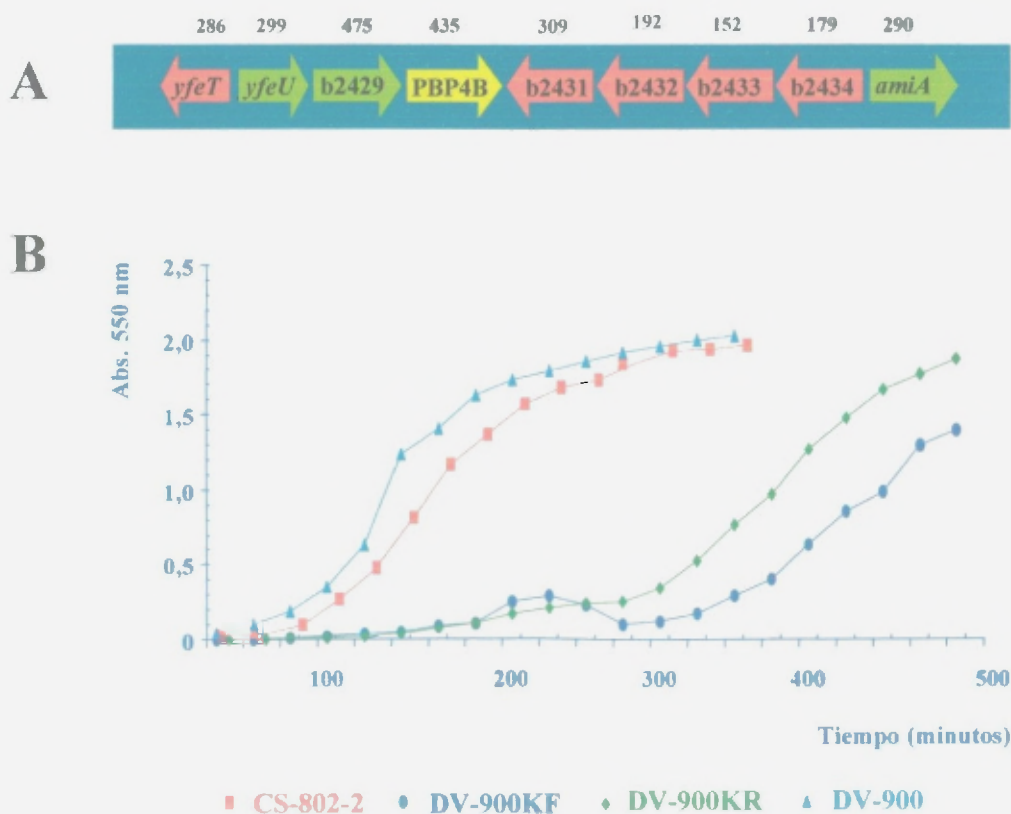


Figura N° 15. Determinación de los tiempos de generación y entorno genético de *pbp4b*. (B) Curvas de crecimiento de CS-802-2 y los mutantes derivados de la inactivación de *pbp4b*. El crecimiento se realizó en LB a 37 °C (suplementado con kanamicina 30 µg/ml en caso de los mutantes DV-900KF y KR) en agitación constante. Puede observarse además un detalle del contexto genético para *pbp4b* en *E. coli* (A)

A fin de determinar si existen variaciones a nivel morfológico en los mutantes generados, se realizaron observaciones microscópicas empleando FRET (ver figura N° 16). Los cambios morfológicos apreciados en el mutante DV-900, tales como incremento en el diámetro celular, formas alargadas con descontrol del sitio de septación, se asemejan mucho a los que presenta el mutante CS-802-2, demostrando esto la no esencialidad de la putativa actividad DD-CPasa en el contexto genético ensayado.

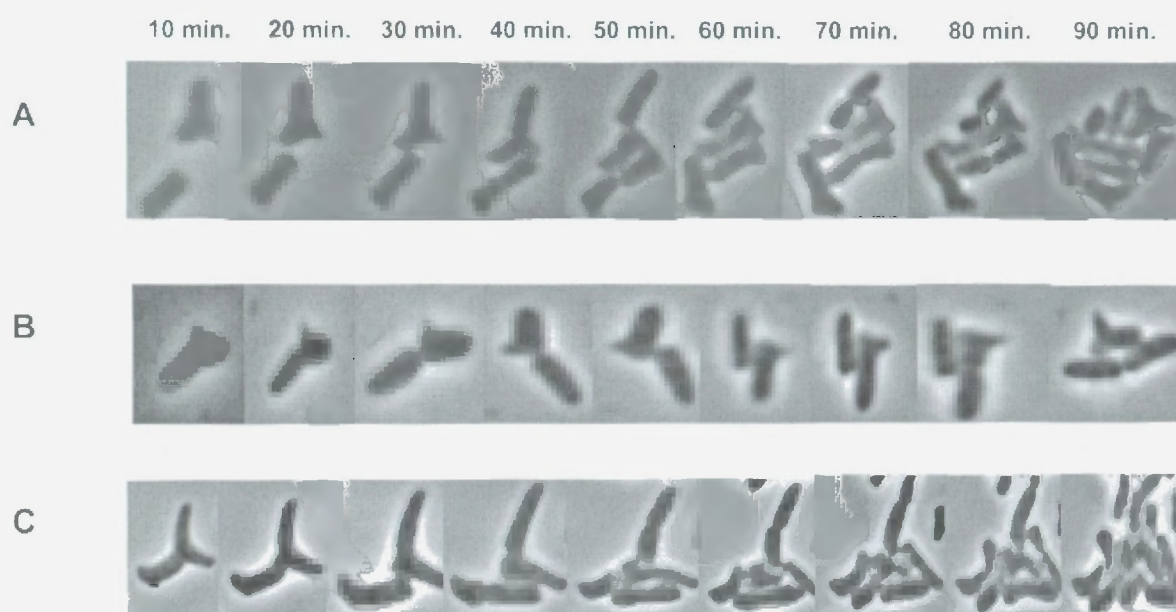


Figura N° 16. Visualización microscópica in vivo usando FRET en campo claro. (A)CS-802-2, (B) DV-900-KF y (C) DV-900. Los resultados muestran una similitud entre las aberraciones morfológicas observadas en DV-900 y el mutante del cual procede, CS-802-2.

Según los resultados obtenidos: comparación de los tiempos de generación, observación morfológica in vivo, y habiéndose verificado de que el contexto genético de DV-900 no había sido alterado, se emplearon estos mutantes para determinar si a nivel de composición de muropéptidos había ocurrido alguna alteración que nos indicara la posible implicación funcional del gen codificante para PBP4B en el proceso de biosíntesis del PG (extraído y analizado según se detalla en el apartado 8,5 de materiales y métodos).

Los valores esperados para el pico del cromatograma M5 en la estirpe DV-900 mostraron una leve variación en comparación con los valores del mutante CS-802-2 mostrándonos una posible actividad DD-CPasa. De igual manera la comparación de los valores obtenidos para el pico correspondiente a D45 mostró una ligera variación.

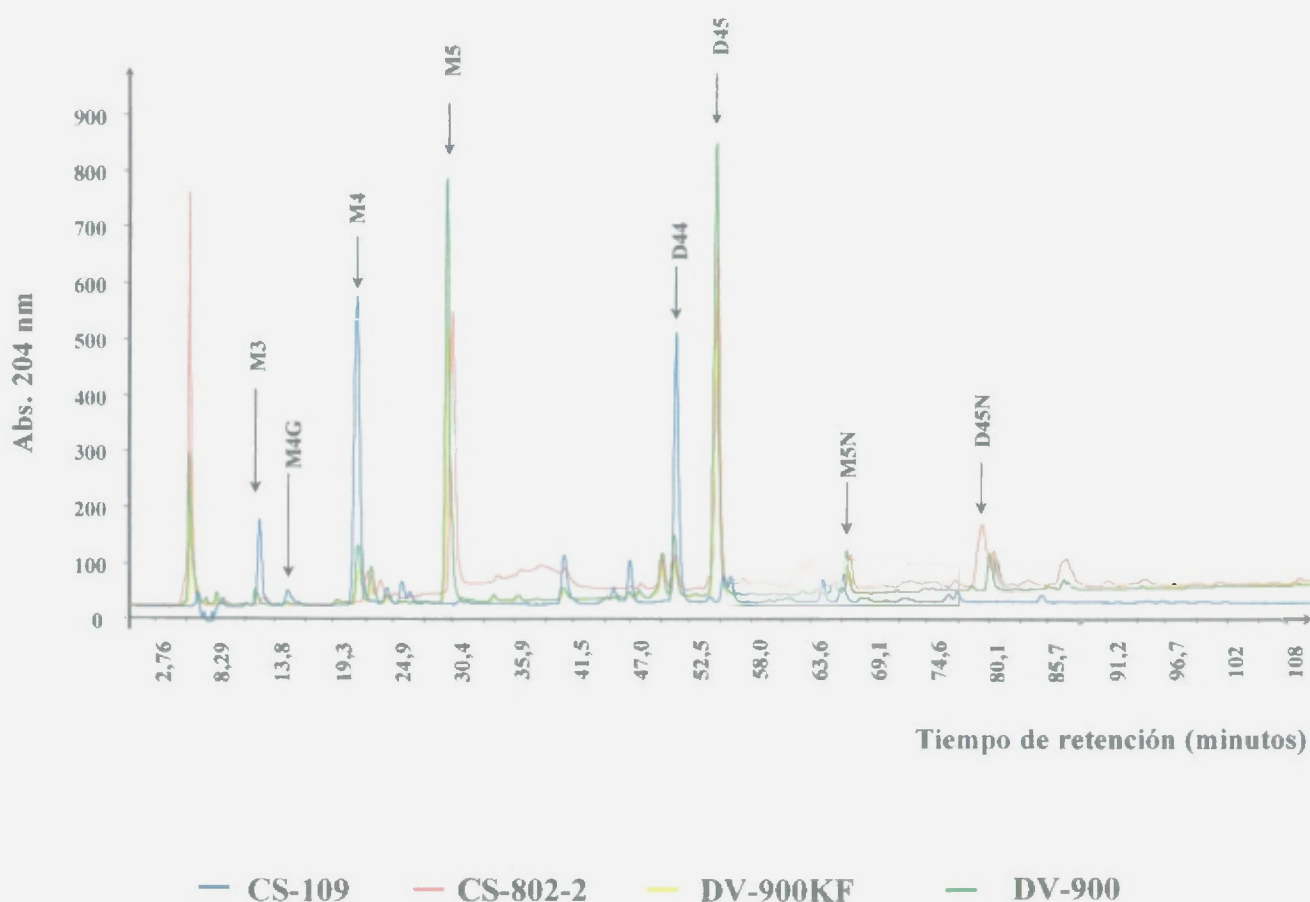


Figura N° 17. Cromatogramas obtenidos por análisis en HPLC del PG de las estirpes CS-109, CS-802-2, DV-900 KF y DV-900 crecidos en LB a 37 °C

5. Clonaje, expresión, purificación y determinación de la actividad enzimática de PBP4B.

Se realizó una estrategia de clonaje dirigida a lograr la expresión del gen *pbp4b* de CS-109 bajo el control de un promotor fuerte e inducible por IPTG a fin de obtener cantidades elevadas de proteína, para realizar ensayos y determinar detalles funcionales de la misma.

En la siguiente figura se muestran los resultados de la amplificación por PCR, se obtuvo el gen flanqueado por sitios de reconocimiento para enzimas de restricción *NheI* y *HindIII*. Al final de cada ciclo de amplificación la polimerasa añade inespecíficamente una adenina al final del fragmento, permitiéndonos ligarlo al vector pCR2.1 y poder digerir de manera apropiada el gen para ligarlo al vector pET28b, digerido también con las mismas enzimas (ver apartado 8 de materiales y métodos).

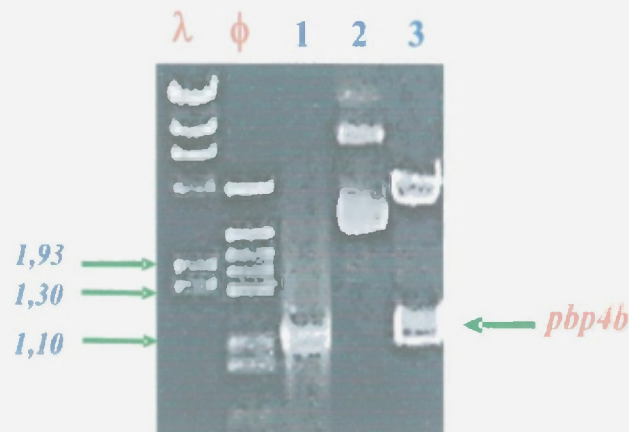


Figura N° 18. Estrategia de clonaje empleada para el clonaje de *pbp4b*.

(1) *pbp4b* amplificado por PCR empleando como molde el ADN genómico de CS-109, y se ligo a pCR2.1 generándose el plasmido pCR2.1/*pbp4b* (2), se verificó el correcto tamaño del producto de la ligación por digestión con *NheI*/*HindIII* (3).

La construcción genética obtenida, pET28b-*pbp4b*, fue transformada en BL21(DE3) y se ensayaron diferentes condiciones de cultivo y sobreexpresión, obteniéndose mejores resultados en la condiciones de crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con kanamicina 30 µg/ml a 21°C con un tiempo de inducción de 16 horas por IPTG 1 mM y extrayendo las proteínas de la membrana con sarkosil 1%. (Se probaron distintos detergentes: Tween 20, Triton X100 y NP40 dando mejor resultados el tratamiento con sarkosil). Bajo estas condiciones se obtuvieron las proteínas de membrana extraídas por acción del detergente y se purificó a través de columnas de níquel eluyendo finalmente en imidazol.

La proteína purificada fue sometida a diálisis y liofilización a fin de eliminar el imidazol y concentrarla. La figura N° 19, muestra los resultados de purificación obtenidos:



Figura N° 19. Purificación de PBP4B de *E. coli*. SDS-PAGE 10%, teñido por Sypro Ruby (Molecular Probes). En la línea (A) Membranas de BL21(DE3)/pET28b-PBP4B, inducido por IPTG 1 mM y tratadas con sarkosil, (B) Paso de la Muestra, (C) Lavado 1, (D) Lavado 2 (ambos con 20 mM de Imidazol), (E) Elución por 125 mM, (F) 250 mM y (G) 500 mM de Imidazol.

A fin de determinar si el producto del gen codificante para nuestra putativa PBP4B, es realmente una proteína capaz de unir penicilina, se utilizó un método relativamente nuevo, sensible, rápido y no radioactivo, para la detección y estudio de las PBPs. Este método utiliza Bocillin-FL, una penicilina fluorescente que permite la rápida detección de perfiles de PBPs en *E. coli*. Los perfiles obtenidos son virtualmente idénticos a los reportados anteriormente empleando penicilina marcada con ^3H , ^{14}C o ^{125}I .⁽⁸⁷⁾

Para este ensayo se emplearon las membranas purificadas de diversas estirpes de *E. coli* a fin de poder apreciar las diferencias entre los patrones de unión a Bocillin-FL. Las concentraciones de membranas empleadas fueron medidas empleando el BCA Protein Assay Kit de Pierce, obteniéndose los siguientes resultados en mg/ml: CS-109 (1,3), CS-802-2 (10,6), DV-900 (14,95), DV-900KF (9,19), DV-900KR (11,28), BL21(DE3)/pET28b-PBP4B (7,2) y BL21(DE3)/pET28b-PBP4B inducido por IPTG 1mM (7,03).

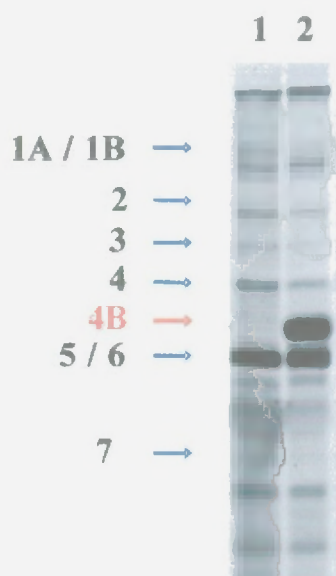


Figura N° 20. Unión a Bocillin-FL por PBP4B.

Gel SDS-PAGE 10% visualizado por Typhoon, se muestran las membranas de (1), BL21(DE3)/ pET28b-PBP4B + Bocillin FL y (2), BL21 (DE3) / pET28b -PBP4B inducido por IPTG 1 mM + Bocillin-FL .

Los resultados muestran que PBP4B es capaz de fijar penicilina (Figura N° 20), por lo tanto queda confirmado que es una PBP. Se determinara entonces, cual es su actividad enzimática (posible actividad DD-CPasa) en el proceso de biosíntesis de PG, usando para ello como sustrato el disacárido-pentapéptido M5 (NAcMur-NAcGlc-L-ala-Dglu-m-DAP-D-ala-D-ala) y el tripéptido N α , N ϵ - Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (ver apartados 8,7 y 8.8 de materiales y métodos). La figura N° 21, muestra un esquema de la reacción llevada a cabo por una DD-CPasa cuando se pone en contacto con el sustrato sintético tripéptido, que permitirá determinar fotocolorimetricamente la liberación de cantidades muy pequeñas de D-ala. (Figura N° 22)

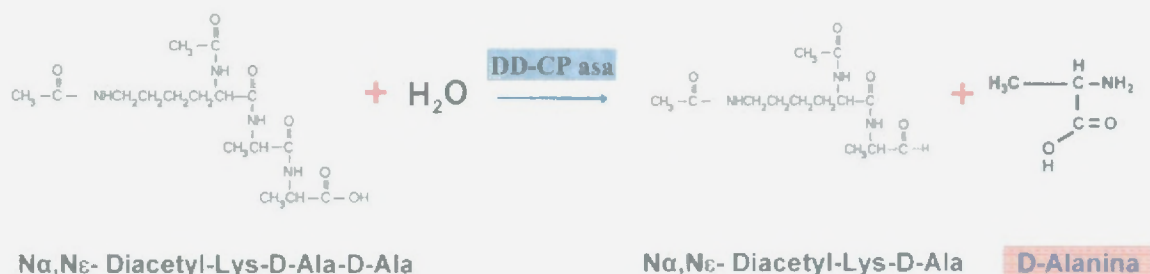


Figura N° 21. Esquema de la reacción estándar de DD-CPasa.

1 Unidad de DD-CPasa cataliza la hidrólisis de 1 μmol de N α ,N ϵ - Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala en D-Alanina y N α ,N ϵ - Diacetyl-Lys-D-Ala por minuto a 37° C bajo condiciones de saturación.

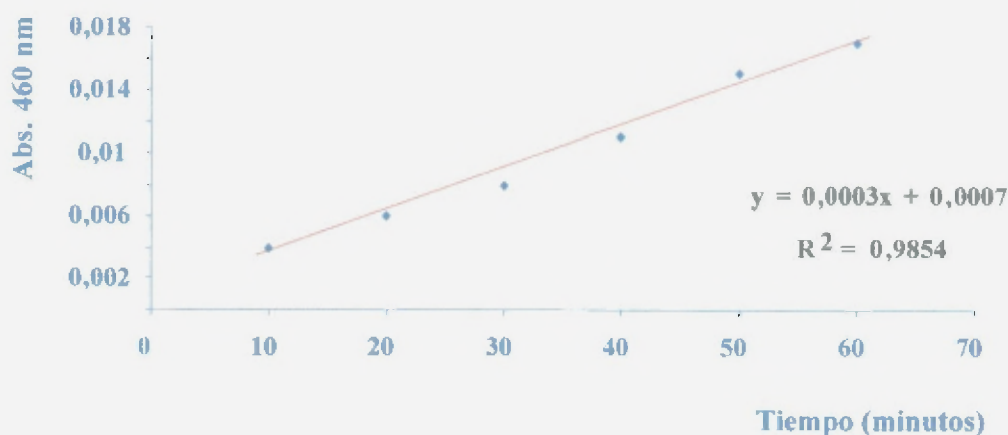


Figura N° 22. Determinación de la actividad DD-CPasa de PBP4B
Se empleó como sustrato el tri péptido $N\alpha, N\epsilon$ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala. Se aprecia una actividad muy baja a una hora de reacción.

En el volumen de reacción (30 μ l) tenemos 12,5 mM de $N\alpha, N\epsilon$ -Diacetyl-Lys-D-Ala-D-Ala (375 nanomoles) de los cuales se han liberado aproximadamente 2 nanomoles de D-Ala (Absorbancia a 460 nm: 0,017) en una hora a 37 °C y en condiciones de saturación de sustrato. En conclusión, PBP4B, presenta una actividad DD-CPasa muy baja, en las condiciones de ensayo empleadas.

Otra alternativa empleada para determinar la actividad DD-CPasa de PBP4B, fue emplear como sustrato el disacárido-pentapéptido M5 (NAcMur-NAcGlc-L-ala-Dglu-m-DAP-D-ala-D-ala) purificado y desalado por HPLC a partir del PG de DV-900. Se ensayaron diferentes condiciones de reacción, tales como rangos de pH de 7 a 8, presencia o ausencia de sarkosil, tiempos de incubación de 30 minutos hasta 24 horas, temperaturas de incubación de 20 °C a 37°C, entre otras. Los resultados obtenidos no se muestran, ya que en las condiciones ensayadas no se demostró una actividad D-CPasa de PBP4B, por ello se continúan ensayando variaciones en las condiciones de reacción a fin de lograr mejores resultados.

A fin de determinar si PBP4B presenta actividad β -lactamasa, se realizó el clonaje de PBP4B y AmpC en el vector pK18, verificándose el correcto clonaje por restricción con las enzimas EcoRI/Hind III para el caso de AmpC y XbaI/Hind III para PBP4B. (Figura N° 23)

Se realizó el clonaje de los genes *pbp4b* y *ampC* en el vector pK18, ya que presenta el gen de resistencia a kanamicina interrumpiendo el gen de resistencia a ampicilina (β -lactamasa), lo cual nos permitirá realizar de manera apropiada el ensayo de determinación de la actividad β -lactamasa en los transformantes de CS-109, CS-802-2 y DV-900 empleando nitrocefín.

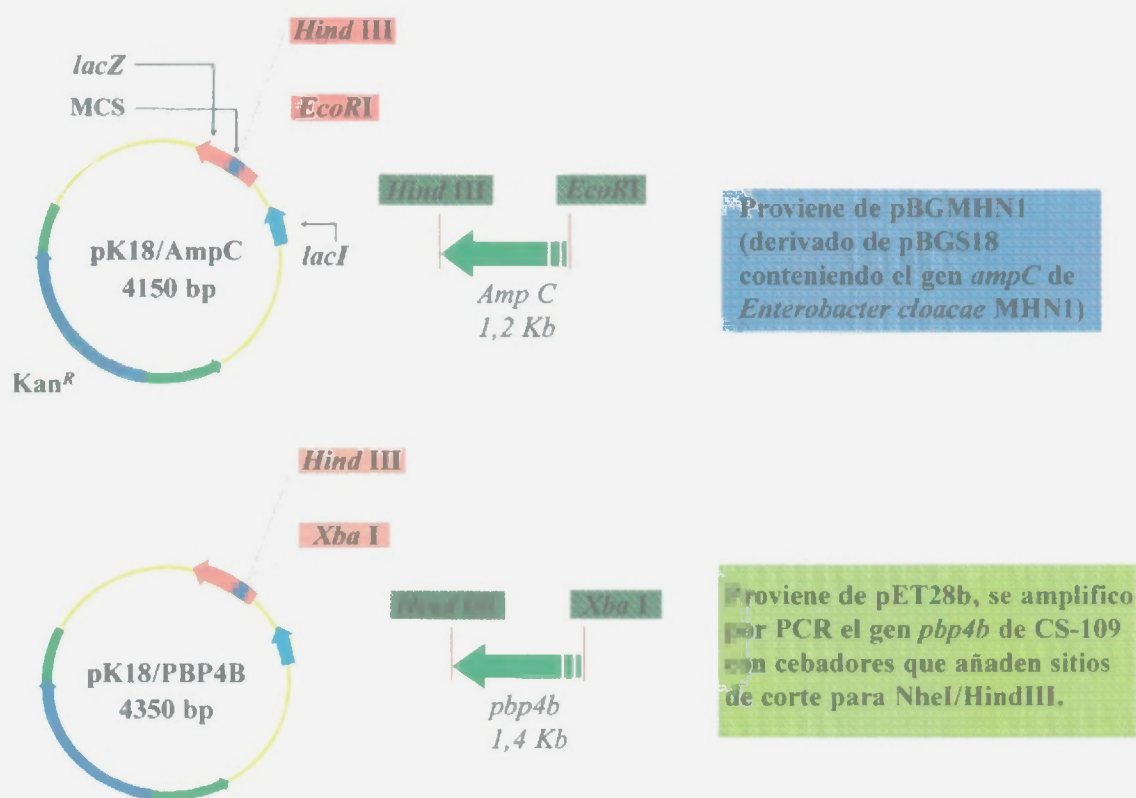


Figura N° 23. Estrategia de clonaje para AmpC y PBP4B en pK18. Se empleó el vector pK18 (3,95 Kb) que es un derivado de pUC118, al cual se le ha interrumpido el gen de resistencia a ampicilina por el gen de resistencia a kanamicina.

Se utilizaron diluciones de los cultivos ensayados (es importante usar siempre transformantes frescos debido al problema de expresión de AmpC en Enterobacterias, particularmente en *Salmonella*), así como extractos citoplasmáticos (para AmpC) y extractos de membrana (para PBP4B). Los resultados mostraron una elevada actividad β -lactamasa de AmpC, por el contrario no se apreciaron resultados positivos para PBP4B. (ver figura N° 24)

Tabla N° 12

Estirpes Analizadas	Absorbancia 486 nm
CS-109	0,050
CS-109 X IPTG	0,041
CS-109/pK18-AmpC	0,420
CS-109/pK18-AmpC X IPTG	0,870
CS-109/pK18-PBP4B	0,036
CS-109/pK18-PBP4B X IPTG	0,051
CS-802-2	0,052
CS-802-2 X IPTG	0,040
CS-802/pK18-AmpC	0,910
CS-802/pK18-AmpC X IPTG	0,980
CS-802/pK18-PBP4B	0,042
CS-802/pK18-PBP4B X IPTG	0,050
DV-900	0,043
DV-900 X IPTG	0,051
DV-900/pK18-AmpC	0,920
DV-900/pK18-AmpC X IPTG	0,978
DV-900/pK18-PBP4B	0,030
DV-900/pK18-PBP4BX IPTG	0,042

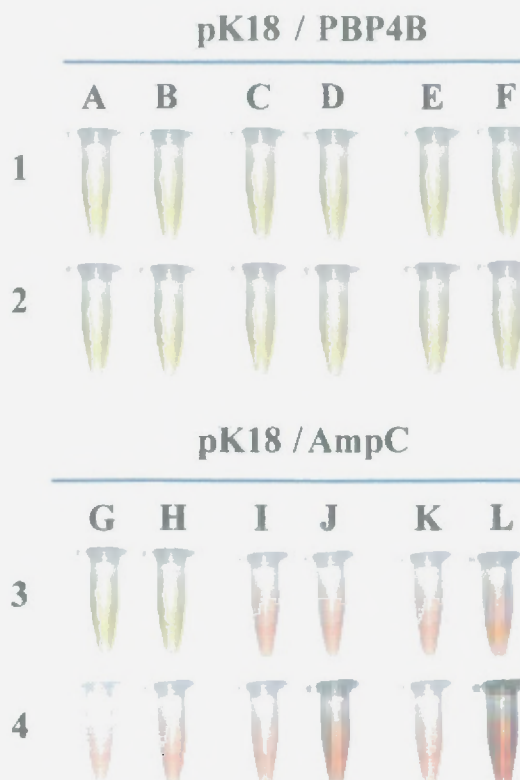


Figura N° 24. Ensayo de Nitrocefin para la determinación de la posible actividad β -lactamasa de PBP4B. 1 y 3 hacen referencia al momento inicial del experimento (minuto 1), correspondiendo 1A, 1C y 1E a CS-109, CS-802-2 y DV-900 transformadas con pK18/PBP4B y 3G, 3I y 3K a CS-109, CS-802-2 y DV-900 transformadas con pK18/AmpC. Las inducciones respectivas de cada una de estas transformaciones corresponden a 1B, 1D, 1F, 3H, 3J y 3L. 2 y 4 hacen referencia al periodo de incubación de 30 minutos a 30°C. Se muestran los valores obtenidos para el ensayo de determinación de la actividad β -lactamasa en la tabla N° 12.

En el caso en que se emplearon extractos de membrana en los ensayos de determinación de actividad β -lactamasa, se corrieron en gel SDS-PAGE 10% y se realizaron tinciones por Coomassie Blue e inmunodetección por Western-Blot. La figura N° 25 muestra la verificación de la sobreexpresión de las proteínas en las construcciones genéticas realizadas.



Figura N° 25. Inmunodetección de PBP4B por Western-Blot, empleando anticuerpos anti-6X His-Tag. SDS-PAGE 10% (1) CS-109/pK18-PBP4B, (2) CS-109/pK18-PBP4B x IPTG 1mM, (3) CS-802-2/pK18-PBP4B, (4) CS-802-2/pK18-PBP4B x IPTG 1mM, (5) DV-900/pK18-PBP4B, (6) DV-900/pK18-PBP4B x IPTG 1mM

6. Análisis del efecto de la sobre expresión de MurF en el proceso de biosíntesis del PG.

Como se indico en la introducción, el proceso de biosíntesis del PG involucra compartimentos celulares tales como el citoplasma, en el que se llevan a cabo los pasos iniciales de generación de la unidad disacáridica (NAcMur-NAcGlu) pentapéptica (L-Ala-D-Glu-mdap-D-Ala) por acción secuencial de las ligasas sitio especificas MurC, MurD, MurE y MurF respectivamente, por ello se pretende evaluar el aspecto esencial de la sobreproducción de MurF, en un contexto genético defectivo en 9 PBPs (DV-900) que nos permitirá determinar la necesidad o no de un tipo en particular de sustrato para la inserción y maduración de nuevo PG.

Se uso la construcción pMLD116K de 6,298 bp, que presenta el gen *murF*, bajo el control del promotor (P_{TRC}) inducible por IPTG, con el gen de resistencia a kanamicina interrumpiendo el gen de resistencia a ampicilina, y evaluar si al sobreproducir MurF, generándose un incremento en la unidad lípido II NAcMur-NAcGlu-pentapéptido y una reducción en la unidad lípido II NAcMur-NAcGlu-tripéptido, es esencial para la biosíntesis del PG.

Se realizo la purificación del vector pMLD116K y se verifico su correcto tamaño por digestión con *Pst*I. Una vez verificada, esta construcción fue transformada en células competentes de CS-109 y DV-900 a fin de evaluar el efecto de la sobreexpresión de MurF en ambos contextos genéticos. , seleccionándose los transformantes por resistencia a kanamicina 30 µg/ml.

Los resultados mostraron una eficiencia de transformación elevada (aproximadamente 10^6) para la estirpe parental CS-109, pero dos órdenes de magnitud menor en el caso del mutantes DV-900. Los transformantes fueron verificados por minipreps y una vez comprobado, se realizo una curva de crecimiento tanto en medio LB como en M9 suplementados con kanamicina 30 µg/ml a 37°C, como se puede apreciar en la figura N° 26.

La curva de crecimiento muestra un comportamiento muy similar entre los transformantes CS-109/pMLD116K y DV-900/pMLD116K, pero cuando se realiza la inducción por IPTG 1mM, se puede apreciar una caída en la velocidad de crecimiento, siendo más notorio el efecto observado para el transformante DV-900/pMLD116K (Ver figura N° 26).

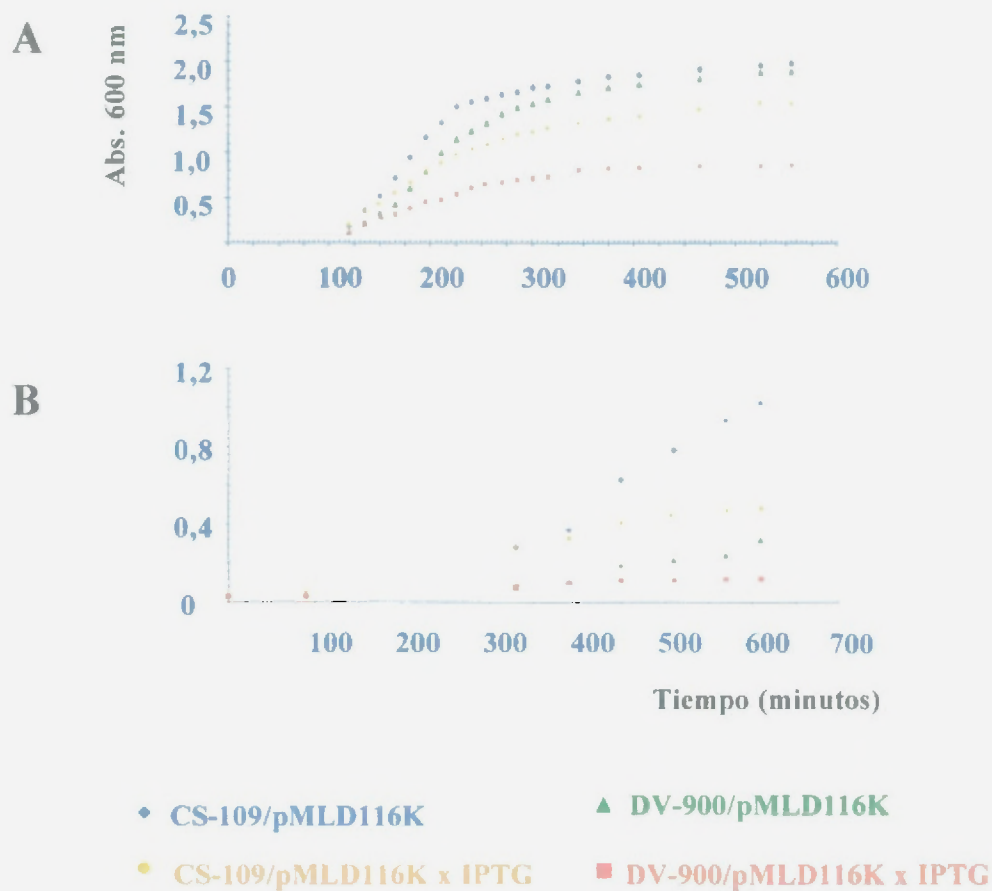
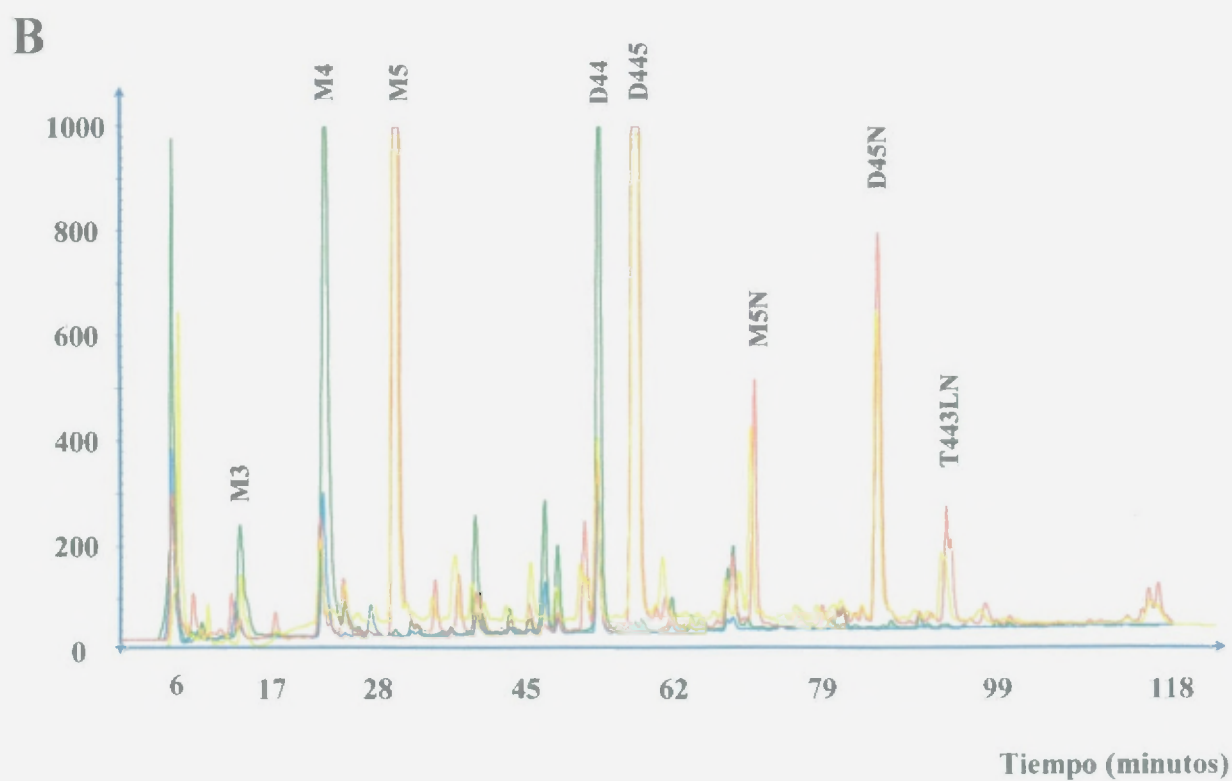
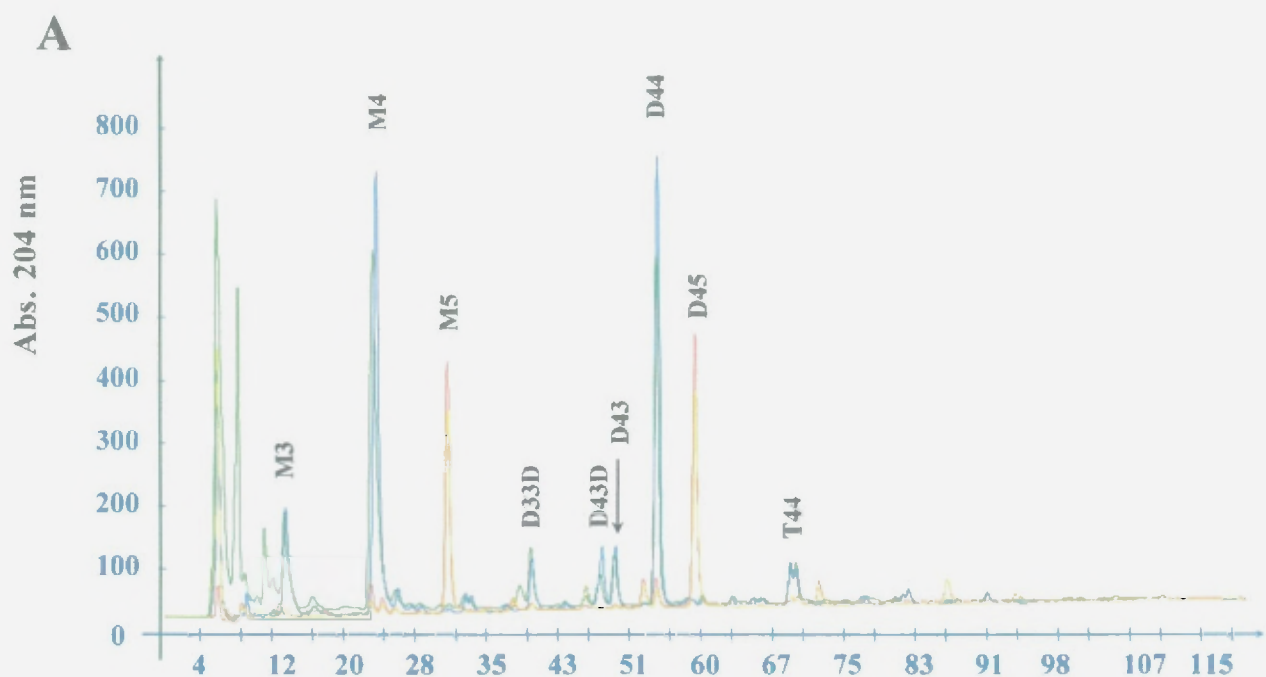


Figura N° 26. (A) curva de crecimiento para CS-109 y DV-900 pMLD116K bajo condiciones de inducción y no inducción por IPTG 1mM en LB kanamicina 30 μ g/ml a 37°C. (B) curva de crecimiento en M9 kanamicina 30 μ g/ml.

Se empleo medio mínimo M9 suplementado con kanamicina 30 μ g/ml, a fin de evitar cualquier escape por parte del promotor inducible por IPTG, ya que este medio presenta una concentración de glucosa del 0,4%, realizándose observaciones in vivo utilizando el FRET (ver figura N° 28). Se extrajo el PG de cultivos en medio mínimo M9 y LB bajo las mismas condiciones empeladas en el ensayo de curva de crecimiento. (Figura N° 27 y tabla N° 13)

Los resultados de actividad especifica para MurF fueron en nanomoles/min/mg de proteína: 8,1 (CS-109), 5000 (CS-109/pMLD116K-MurF), 12810 (CS-109/pMLD116K-MurF x IPTG), 7,2 (DV-900), 295 (DV-900/pMLD116K-MurF) y 2477 (DV-900/pMLD116K-MurF x IPTG), mostrando que aun en condiciones de no inducción hay un nivel elevado de MurF.



- CS-109/pMLD116K - DV-900/pMLD116K
 - CS-109/pMLD116K - IPTG - DV-900/pMLD116K - IPTG

Figura N° 27. Análisis por HPLC del PG
 Cromatogramas mostrando la composición de muopéptidos del PG de CS-109/pMLD116K, CS-109/pMLD116K inducido por IPTG y DV-900/pMLD116K, DV-900/pMLD116K inducido por IPTG crecidos en LB (A) v M9 (B).

Composición / Estirpe	DV-900	DV-900/pMLD116K	DV-900/pMLD116K + IPTG
Monómeros	55.58	60.68	63.83
Dimeros	40.42	39.32	36.17
DAP-DAP	1.46	1.74	2.75
Lipoproteína	3.31	2.76	6.98
Anhidros	10.85	15.62	8.87
Pentapéptido	91.91	88.76	82.53
Cross-linking	40.42	39.32	36.17
D-D / Total	3.62	4.44	7.61
Longitud de cadena	9.22	6.40	11.27
M3	0.14	1.01	1.60
M4	0.79	1.53	1.38
M5	31.58	28.89	28.66
D43	0.59	0.33	0.77
D44	1.77	2.85	2.81
D45	39.80	31.92	33.43
M5N	3.23	4.09	3.38
D45N	7.32	10.98	4.17
D33D + D43D + D53D	1.37	1.11	1.76
D43 + D44 + D45	43.29	39.99	37.95

La tabla N° 13, muestra que el nivel de pentapéptido (total y M5) al contrario de lo esperado baja y al parecer de manera mas notable cuando se induce por IPTG. Hay un descenso del D45, pero un incremento del D45N. Dado que el cross-linking desciende un poco, así como la longitud de cadenas (se hacen mas cortas), por ello se incrementa los dimeros.

Los niveles de M3 y M4 aumentan (M3 en particular) en condiciones de incremento del pentapéptido. El valor para el entrecruzamiento de las cadenas a través de uniones péptidicas de configuración D-D tomando pentapéptido como aceptor, muestran un descenso en comparación del aumento en la actividad L-D.

El nivel de pentapéptido desciende al incrementarse MurF, por tanto la regulación no implica un incremento en pentapéptido en el PG al incrementarse el nivel del precursor lípido II-pentapéptido.

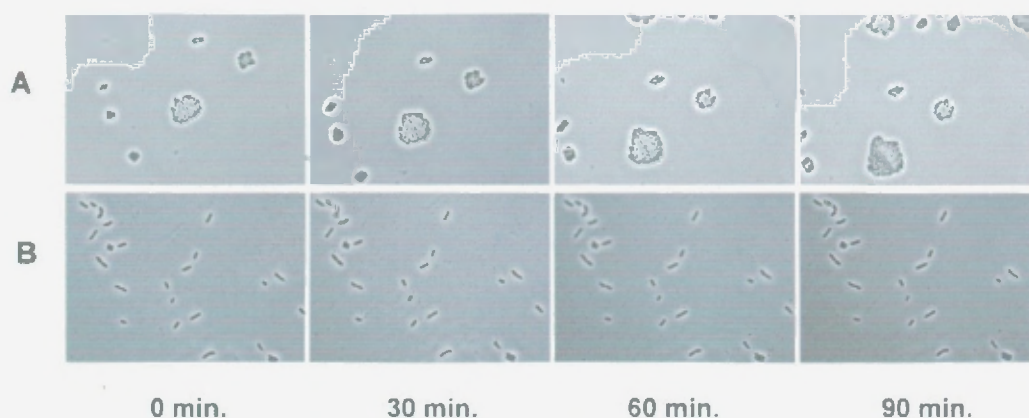


Figura N° 28. Observación microscópica in vivo en campo claro (FRET) de CS-109/pMLD116K-MurF. Se evaluaron diferentes tiempos de crecimiento en agar M9 kanamicina 30 μ g/ml. (A) CS-109/pMLD116K, se puede observar un crecimiento lento. (B) CS-109/pMLD116K inducido por IPTG 1mM. No se observa crecimiento durante los 90 minutos de seguimiento.

Al correr un gel SDS-PAGE 10% de los extractos totales de proteínas de los transformantes analizados, se observó que aun en condiciones de no inducción hay un nivel considerablemente alto de expresión de MurF, ello quizás debido a un escape por efecto del promotor TRC. En condiciones de inducción, casi la totalidad de proteína producida corresponde a MurF. Al parecer la condiciones de cultivo empleadas a fin de evitar este escape, como fue utilizar medio mínimo M9 suplementado con kanamicina, no lograron frenar el escape de la expresión (ver figura N° 29).

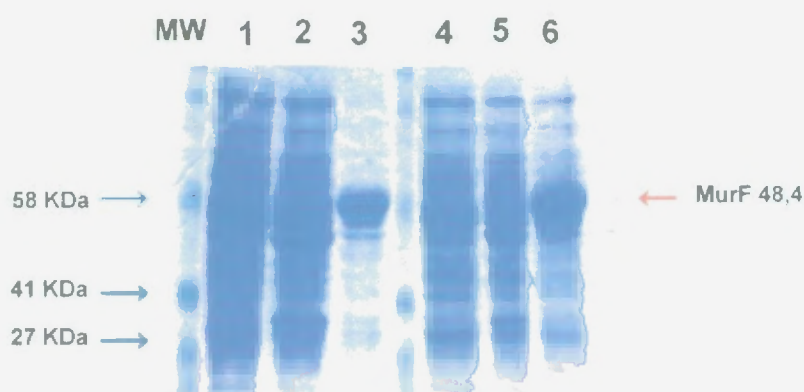


Figura N° 29. Gel de SDS-PAGE al 10%, mostrando la extracción de MurF (1) CS-109, (2) CS-109/pMLD116K y (3) CS-109/pMLD116K inducido por IPTG 1 mM. (4) DV-900, (5) DV-900/pMLD116K y (6) DV-900/pMLD116K inducido por IPTG 1 mM. Los valores de proteínas totales fueron en mg/ml: 2.3, 2, 0.98, 1.7, 1.93 y 1.3 para 1,2, 3,4,5 y 6 respectivamente.

Se evaluó el efecto de la sobreexpresión de MurF en el crecimiento de los transformantes en presencia de concentraciones variables de NaCl, a fin de determinar si se ve afectada la funcionalidad del PG. La figura N° 30, muestra que CS-109 crece mejor en condiciones de ausencia de NaCl, por el contrario cuando se observa el crecimiento de los transformantes CS-109/pMLD116K en condiciones de no inducción, el crecimiento se hace ligeramente mas lento, este efecto es mas notorio cuando se induce por IPTG 1mM. En contraste DV-900, presenta un crecimiento mas lento con intervalos de máximos y mínimos en ausencia de NaCl y los transformantes DV-900/pMLD116K tanto en ausencia o presencia de IPTG 1mM presentaron un crecimiento casi nulo.

Resultados similares se aprecian cuando se incrementa la concentración de NaCl a 0,5 M, aunque el crecimiento de DV-900 se ve ligeramente incrementado. Las restantes concentraciones ensayadas no permitieron el crecimiento de las estirpes.

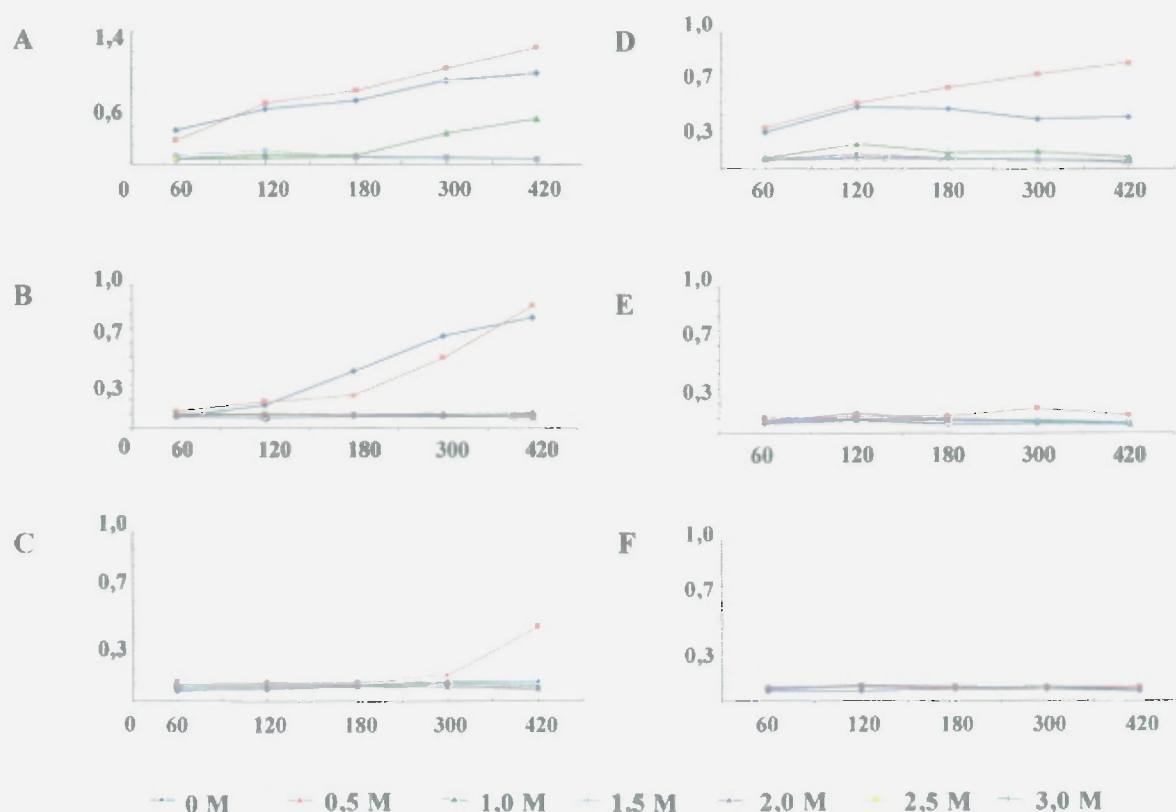


Figura N° 30. Determinación del efecto de la sobre expresión de MurF en el crecimiento en presencia de NaCl. (A) CS-109, (B) CS-109 / pMLD116 K, (C) CS-109 / pMLD116 K - IPTG, (D) DV-900, (E) DV-900 / pMLD116 K y (F) DV-900 / pMLD116 K - IPTG en LB 0 (1) / 0,5 (4) / 1 (2) / 1,5 (5) / 2 (3) y 2,5 (6) de NaCl a 37°C.

7. Sustitución e inactivación genética en SL1344 de los genes *mraZ* y *mraW*.

Otro de los procesos biológicos que centra nuestra atención es la división celular, por ello se pretende evaluar el efecto que produciría sustituir e inactivar los genes *mraZ* y *mraW* presentes al inicio del cluster *dcw*, involucrados en la división celular y biosíntesis del PG mediante la misma técnica empleada para PBP4B. Han sido varias las estrategias realizadas para lograr este objetivo (ver figura N° 31), dando mejor resultado cuando se reemplaza la región genética de interés por otra de tamaño similar y en la misma dirección de transcripción que el cluster.

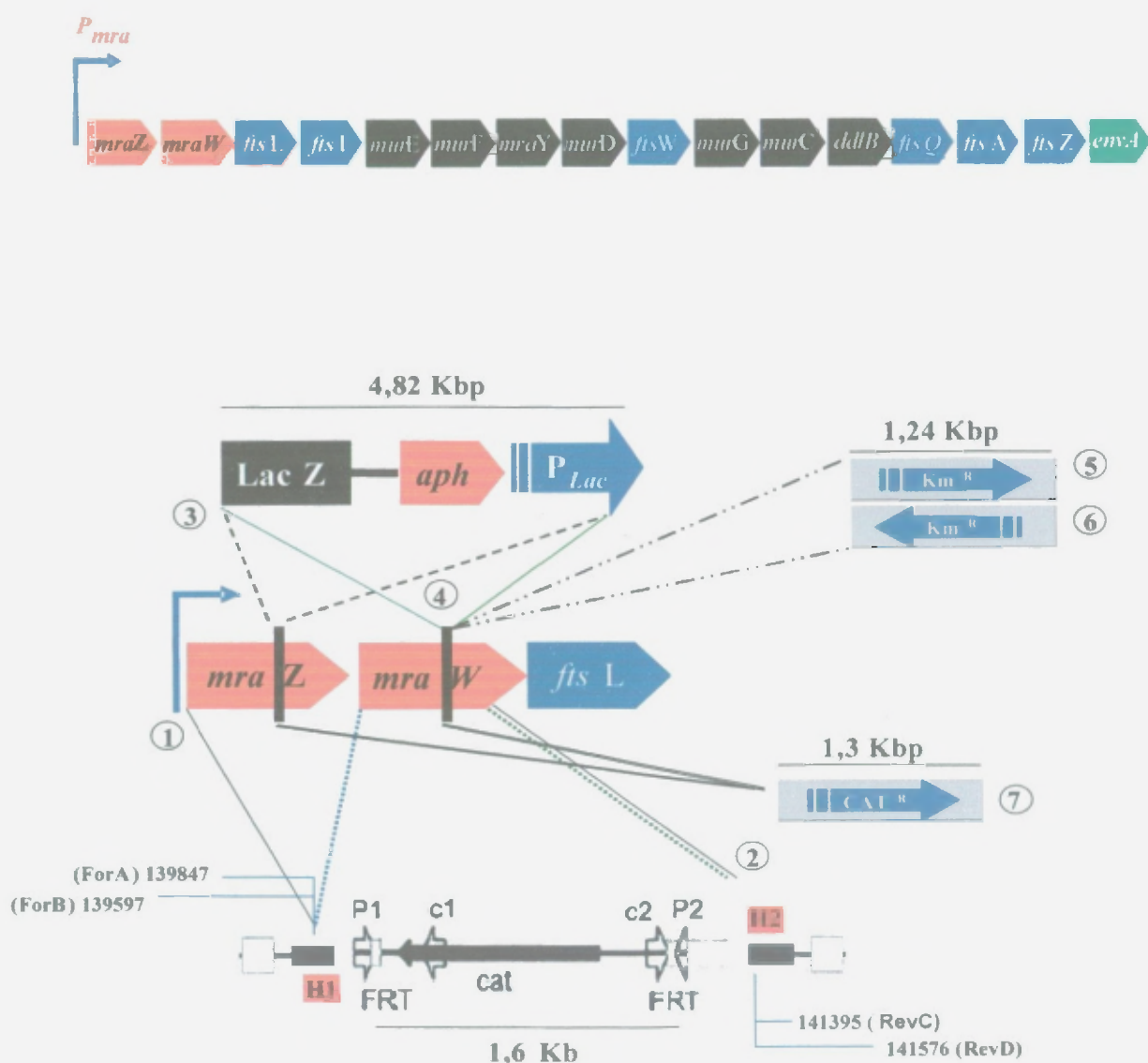


Figura N° 31. Representación esquemática de las estrategias genéticas de inactivación realizadas para *mraZW*. Se muestra el ordenamiento genético del cluster *dcw*. 1 y 2 muestran la estrategia empleada para sustituir y eliminar

La sustitución genética se realizó empleando los genes de resistencia a cloranfenicol en ambas orientaciones (forward y reverse) que presenta un tamaño similar a los genes *mraZ* y *mraW*. El diseño de los cebadores empleados para el reemplazo por recombinación homologa de los genes *mraZ* y *mraW* no afecta la región codificante para la RBS (**R**ibosoma **B**inding **S**ite) del gen *ftsL* ni la región correspondiente a P_{mra} . La orientación de la transcripción en el ordenamiento genético del cluster *dcw* nos señala que todos muestran la misma orientación, de manera que solo fue posible obtener el mutante de sustitución que presentaba el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación forward, mas no así el mutante que presentaba la orientación reverse, ya que estaría afectando la transcripción correcta del promotor P_{mra} .

El resultado fue la obtención de mutantes viables que presentaban los genes *mraZ* y *mraW* sustituidos y eliminados correctamente (SL1344CF y SL1344 $\Delta mraZW$). Esto indicaría la no esencialidad de los genes *mraZ* y *mraW* en el proceso de división celular y biosíntesis del PG.

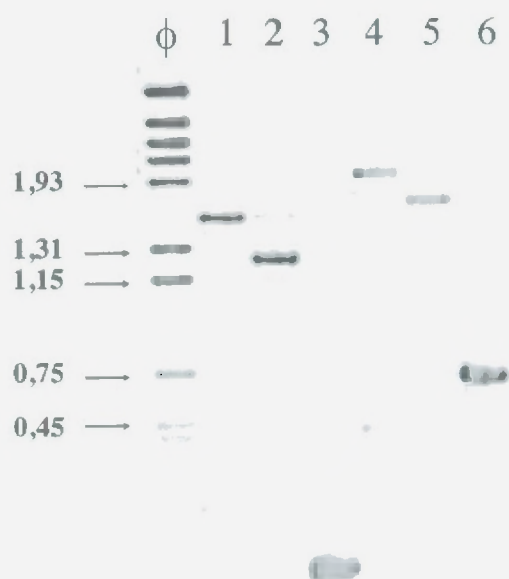


Figura N° 32. Verificación de la correcta sustitución y eliminación de *mraZW* en SL1344.

Gel de agarosa al 1%. (1)(4) SL1344, (2) (5) SL1344CF y (3) (6) SL1344 $\Delta mraZW$ amplificados con los cebadores ForA / RevC (1, 2 y 3) y ForB / RevD (4, 5 y 6)

8. Caracterización de los mutantes generados del reemplazo y eliminación de *mraZW*

Se analizaron a nivel microscópico (FRET), a fin de determinar alteraciones morfológicas entre SL1344 y los mutantes generados. Se observaron formas alargadas y menos móviles en los transformantes por pCP20, estas remitieron al incrementarse la temperatura de incubación a 42°C, indicando que la variación observada era debida al efecto de la expresión de los genes del pCP20. Como controles se generaron transformantes SL1344/pCP20 y DH5α/pCP20, observándose los mismos efectos antes descritos en la morfología y velocidad de crecimiento, los cuales remitían según se incrementaba la temperatura de cultivo. (Ver figura N° 33).

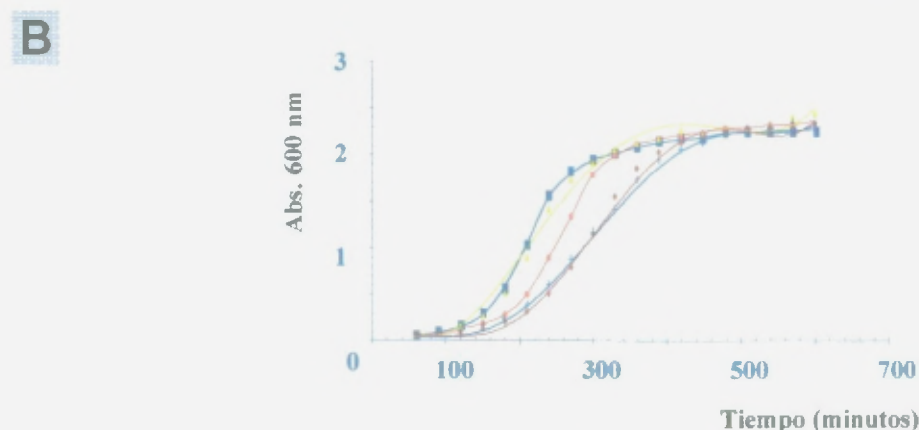
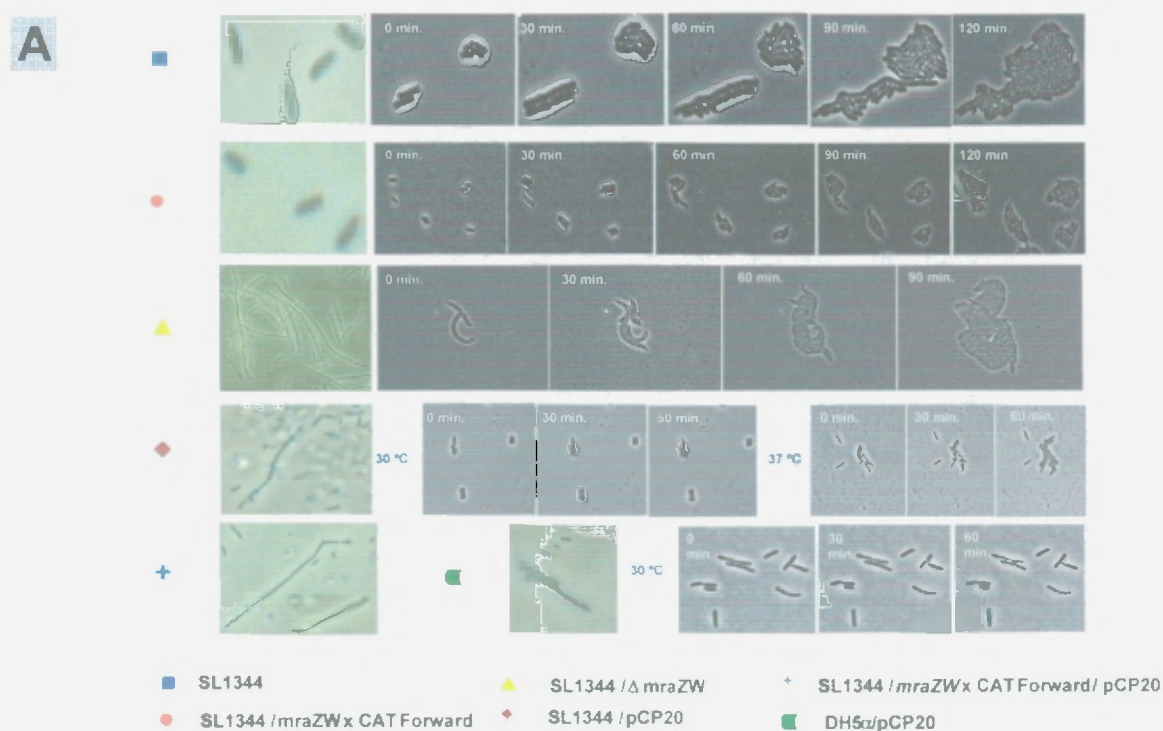


Figura N° 33. Caracterización de los mutantes generados de la inactivación de *mraZW* en SL1344. (A) Observación por FRET de la morfología de SL1344 y los mutantes derivados de la correcta sustitución e inactivación de los genes *mraZ* y *mraW*. (B) Curva de crecimiento a 37°C en LB.

9. Ensayo de infección en células HeLa, NIH/3T3 y NRK por SL1344.

A fin de determinar si la sustitución e inactivación de los genes cromosomales *mraZ* y *mraW* en SL1344 afectaban la capacidad de invasión y proliferación o supervivencia intracelular, se infectaron células eucarióticas permisivas (HeLa) y no permisivas (NRK y NIH/3T3) con los mutantes generados de la sustitución e inactivación de *mraZ* y *MraW* y se recuperaron a diferentes tiempos post infección, haciéndose un recuento de la Unidades Formadoras de Colonias (UFC) a fin de determinar la capacidad de invasión y el índice de proliferación.

Como se puede apreciar en la siguiente figura, los resultados no muestran una variación significativa en la capacidad de invasión tanto en células HeLa como NRK y 3T3, cuando se comparan los mutantes obtenidos contra SL1344, ello indica que las mutaciones causadas no afectan la capacidad de invasión. Cabe mencionar un valor un poco elevado obtenido para el mutante que presenta el gen de resistencia a cloranfenicol en sentido forward en células 3T3.

Por otro lado, cuando se analizaron los valores obtenidos para el índice de proliferación intracelular (ver figura N° 34), se observó una diferencia significativa en el caso de los mutantes que presentan el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación forward reemplazando los genes *mraZ* y *mraW*, este efecto fue mucho mas notorio cuando se empleo la línea celular NRK, aunque los valores para las otras líneas celulares eran de aproximadamente la mitad de lo observado en la estirpe silvestre SL1344. De igual manera, llama la atención el resultado obtenido para el índice de proliferación en el caso del mutante Δ *mraZW* en la línea celular 3T3, que presenta el mismo valor que el mutante resistente a cloranfenicol.

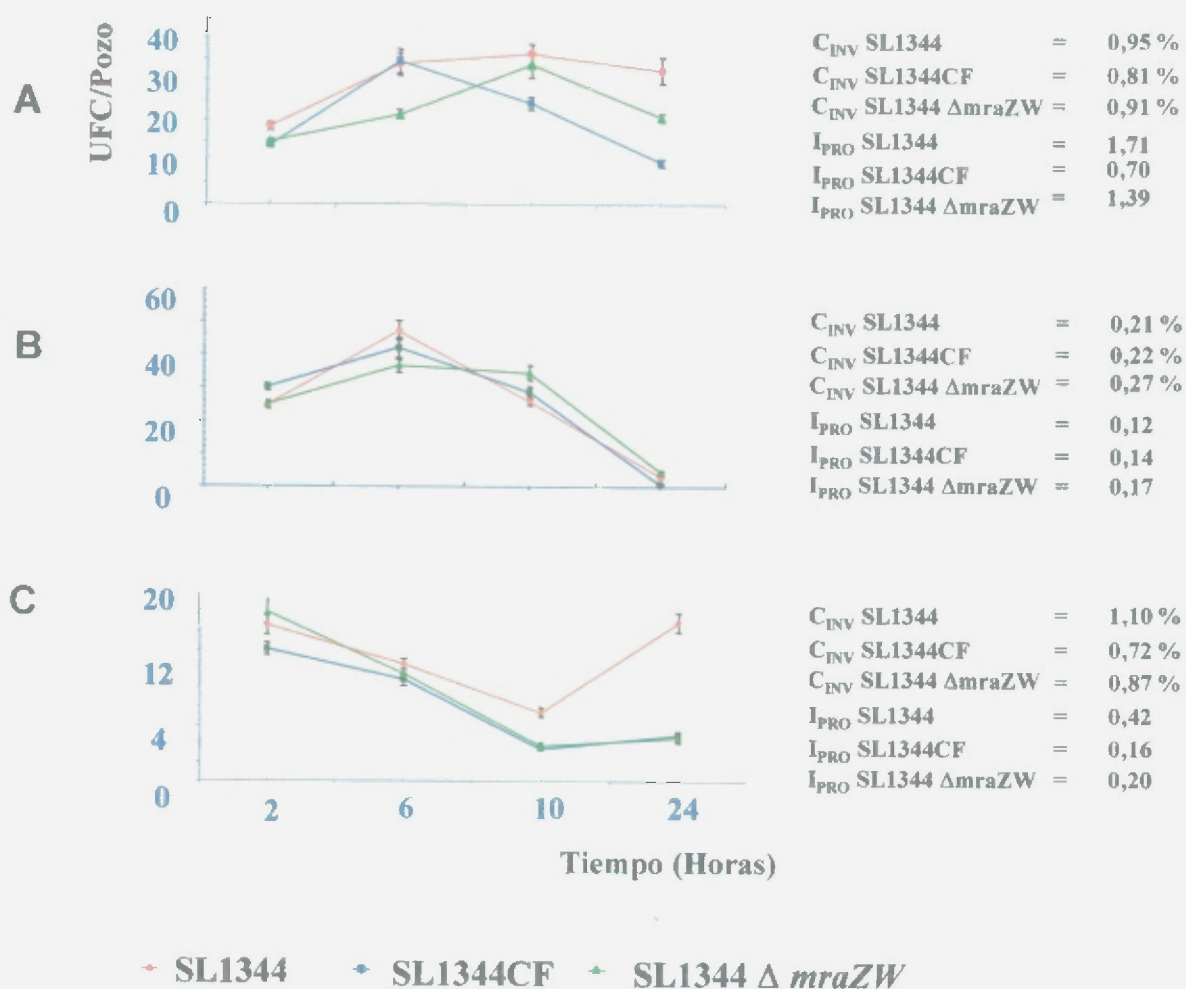


Figura N° 34. Cinética de la proliferación intracelular de SL1344, SL1344CF y SL1344 $\Delta mraZW$. Se emplearon las líneas celulares eucarióticas HeLa(A), NRK (B) y NIH/3T3 (C). Se indican los valores obtenidos para la capacidad de invasión (C_{inv}) y para el índice de proliferación intracelular (I_{pro}).

Se realizó paralelamente un estudio a nivel microscópico (inmunomarcaje) de las líneas celulares infectadas por SL1344, SL1344CF y SL1344 $\Delta mraZW$, de manera que nos permitieran observar el proceso activo de infección y proliferación intracelular en los diferentes periodos de tiempo post-infección ensayado.

Debido a que los resultados obtenidos, pueden diferir de los resultados que puedan ocurrir en el huésped, se realizó el ensayo de infección empleando ratones hembras Balb/C blancas de 5 semanas de edad, para verificar los resultados obtenidos en el experimento anterior. (Ver figura N° 35)

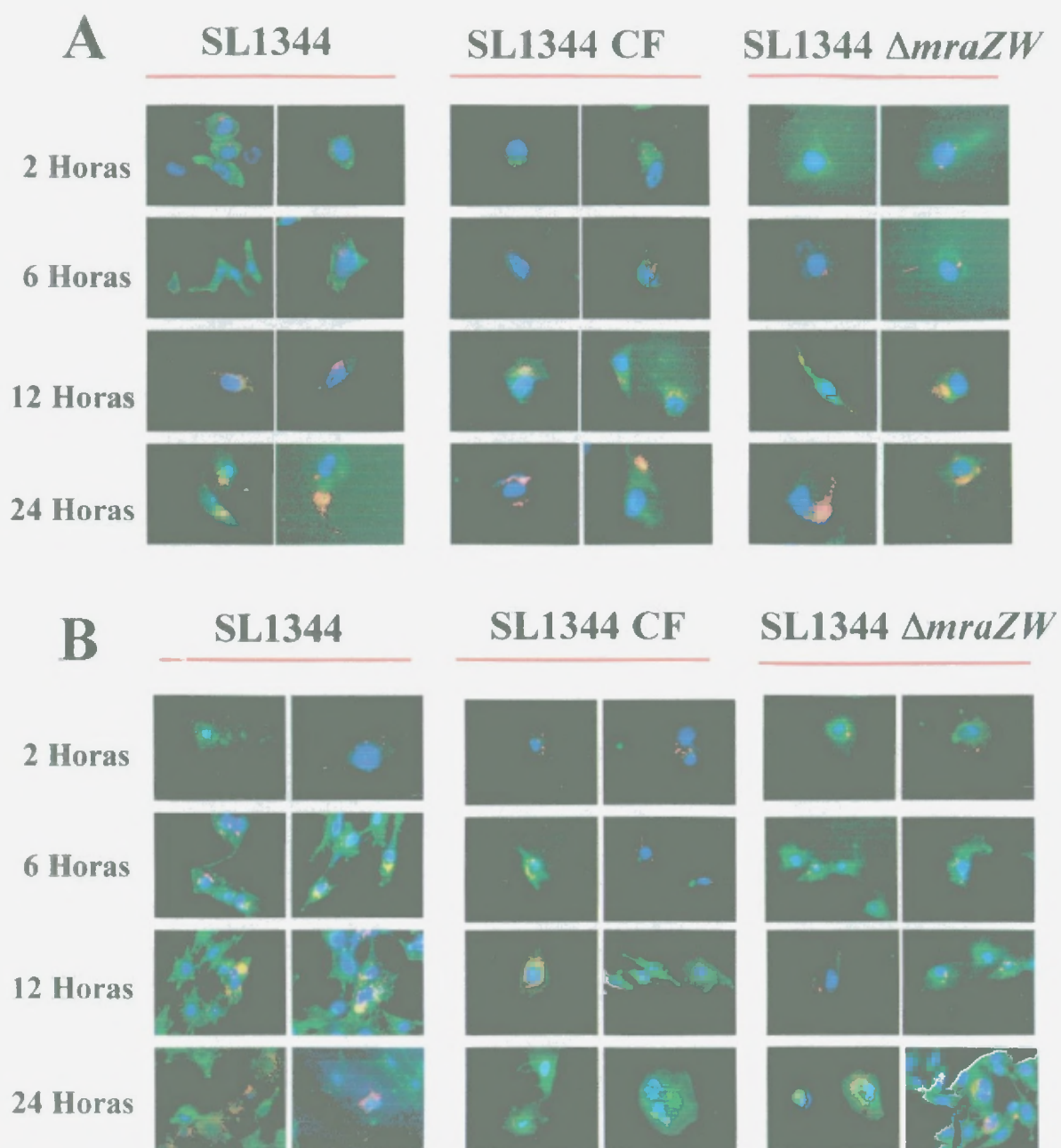


Figura N° 35. Microfotografías del inmunomarcaje del ensayo de infección intracelular

Se emplearon las líneas celulares eucariotas (A) HeLa y (B) NRK, tras diferentes tiempos post infección (2, 6, 12 y 24 horas) por la estirpe SL1344, SL1344CF y SL1344 $\Delta mraZW$. La técnica de inmunofluorescencia se detalla en el apartado 6 de materiales y métodos. En verde, la faloidina (citoplasma), azul el DAPI (núcleo) y en rojo el LPS (bacteria). Se debe indicar que las microfotografías que se muestran son imágenes representativas de cada uno de los tiempos post infección y no corresponden a los valores obtenidos en los recuentos.

Como se aprecia en la figura N° 36, hay una reducción en la virulencia de los mutantes en comparación con SL1344, siendo más notoria esta variación en el caso del mutante SL1344CF, llegando inclusive a ser avirulento a dosis de infección de 10^5 UFC. Las otras dosis ensayadas 10^6 y 10^7 muestran una DL_{50} mas extendida (12-14 días) cuando se comparan con el efecto causado por SL1344 en la población de ratones ensayada. Por su parte el mutante SL1344 $\Delta mraZW$ presenta menos virulencia que SL1344, pero se muestra ligeramente más virulento que el mutante SL1344CF.

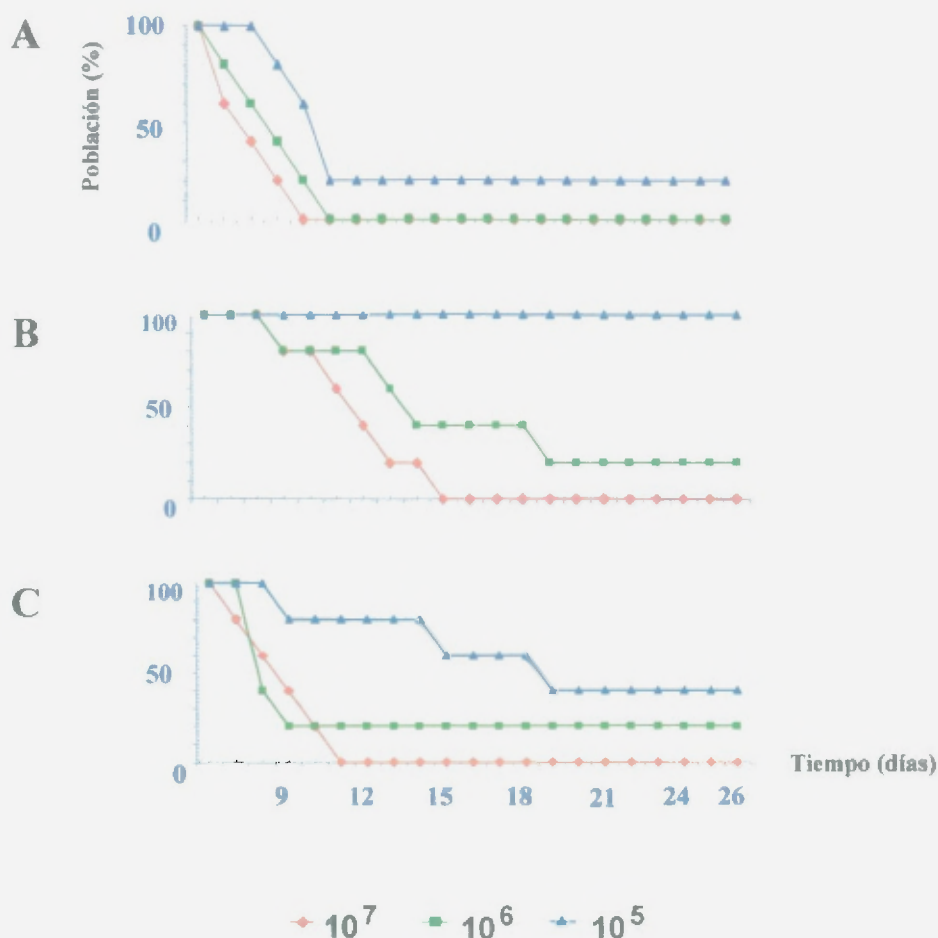


Figura N° 36. Curvas de supervivencia de ratones Balb/C Infectados por SL1344 (A), SL1344CF (B) y SL1344 $\Delta mraZW$ (C). En colores se muestran las diluciones utilizadas para realizar la infección por vía oral. Se aprecia que el mutante SL1344CF es menos virulento.

Los ratones que murieron durante el desarrollo la infección oral por SL1344, SL1344CF y SL1344 $\Delta mraZW$, se recolectaron y se les extrajo el hígado y el bazo en condiciones de esterilidad a fin de realizar el conteo de las UFC presentes en ambos órganos. Los resultados obtenidos, coincidieron con los valores teóricos esperados, es decir, 10^9 UFC para el hígado y 10^8 para el bazo.

10. Cuantificación de la expresión de los genes del cluster *dcw*.

El ARN de SL1344 y los mutantes SL1344CF y SL1344 $\Delta mraZW$, fue purificado (según las especificaciones de Quiagen para el Rneasy Midi/Maxi kit) y usado para analizar la expresión de los genes presentes en el cluster *dcw*, a través de RT-PCR cualitativa y cuantitativa.

La figura N° 37, muestra las diversas eluciones obtenidas de los cultivos crecidos en fase logarítmica, la tercera elución no fue sometida a tratamiento por ADNasa. El ARN purificado fue sometido a un ensayo de PCR a fin de evaluar la calidad del RNA y de que no presentaba contaminación por ADN, dando resultado positivo solo la 3ª elución no tratada con ADNasa.

Se emplearon las dos primeras eluciones para realizar la RT-PCR cualitativa, diseñándose cebadores que reconocen los genes codificantes para FtsZ, FtsW, PBP3, MraZ y MraW y como gen reporter se empleo *rpoD*.

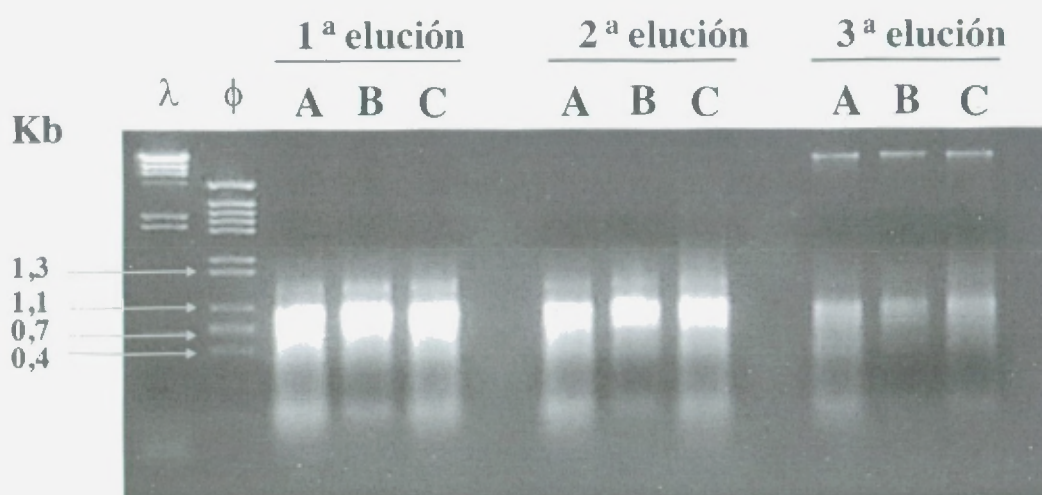


Figura N° 37. Se muestra los resultados obtenidos para la purificación de RNA SL1344 (A), mutante que presenta el gen de resistencia a cloranfenicol en orientación forward reemplazando los genes *mraZ* y *mraW* (B) y mutante $\Delta mraZW$ (C), crecidos en medio LB a 37°C y colectados a fase logarítmica de crecimiento. La medición de la concentración de cada una de las muestras se realizó utilizando el Nanodrop.

Los parámetros empleados para la amplificación de la RT-PCR cualitativa y cuantitativa se indican en la sección de materiales y métodos. Las RT-PCR se realizaron según las especificaciones de la casa comercial Quiagen.

Como muestra la figura N° 38, no ocurre amplificación en los genes *mraZ* y *mraW* en las estirpes SL1344CF y SL1344 Δ *mraZW*, verificándose la correcta sustitución e inactivación de estos genes. Así mismo se aprecia la amplificación en los genes del cluster seleccionados para el ensayo, así como el gen reporter.

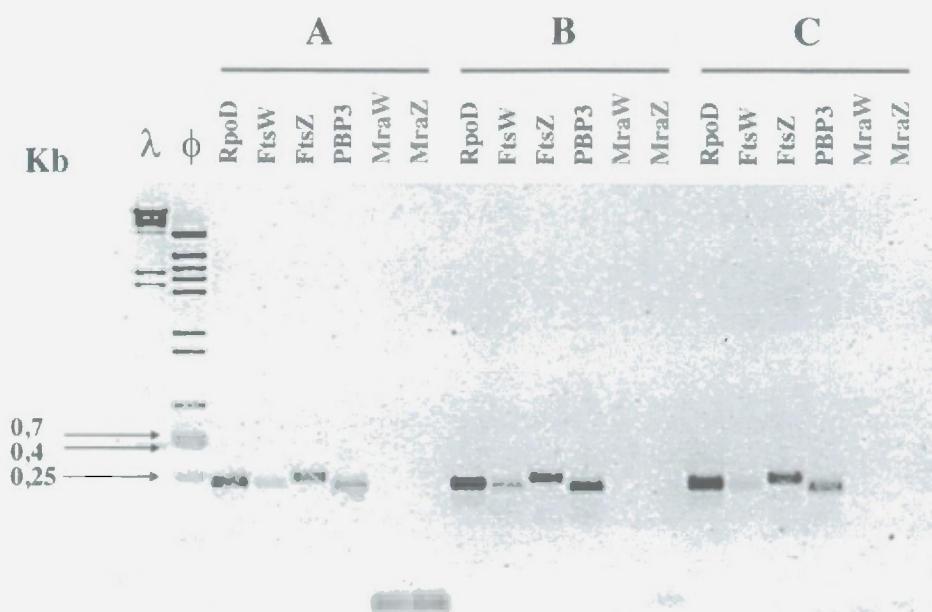


Figura N° 38. Resultados de la RT-PCR cualitativa de SL1344 (A), mutante resistente a cloranfenicol (B) y mutante Δ *mraZW* (C). El diseño de los cebadores empleados en este ensayo nos permite obtener productos muy pequeños de amplificación (< 600 bp) , lo cual permite realizar de manera apropiada tanto la RT-PCR cualitativa como la cuantitativa.

Cualitativamente, este ensayo indica la correcta obtención de los mutantes, pero es importante determinar el nivel de expresión que ocurre en los genes del cluster cuando se halla alterada la correcta expresión del ordenamiento genético al sustituir o eliminar los genes *mraZW*.

Por ello se realizó el análisis de RT-PCR cuantitativa según las especificaciones de la casa comercial Amersham para el kit Ready-to-Go RT-PCR Beads, empleándose el lighcycler de Roche para realizar las amplificaciones. Los resultados de la RT-PCR cuantitativa se corrieron en geles de agarosa conteniendo formaldehído y se tiñeron con bromuro de etidio. (Ver figura N° 39)

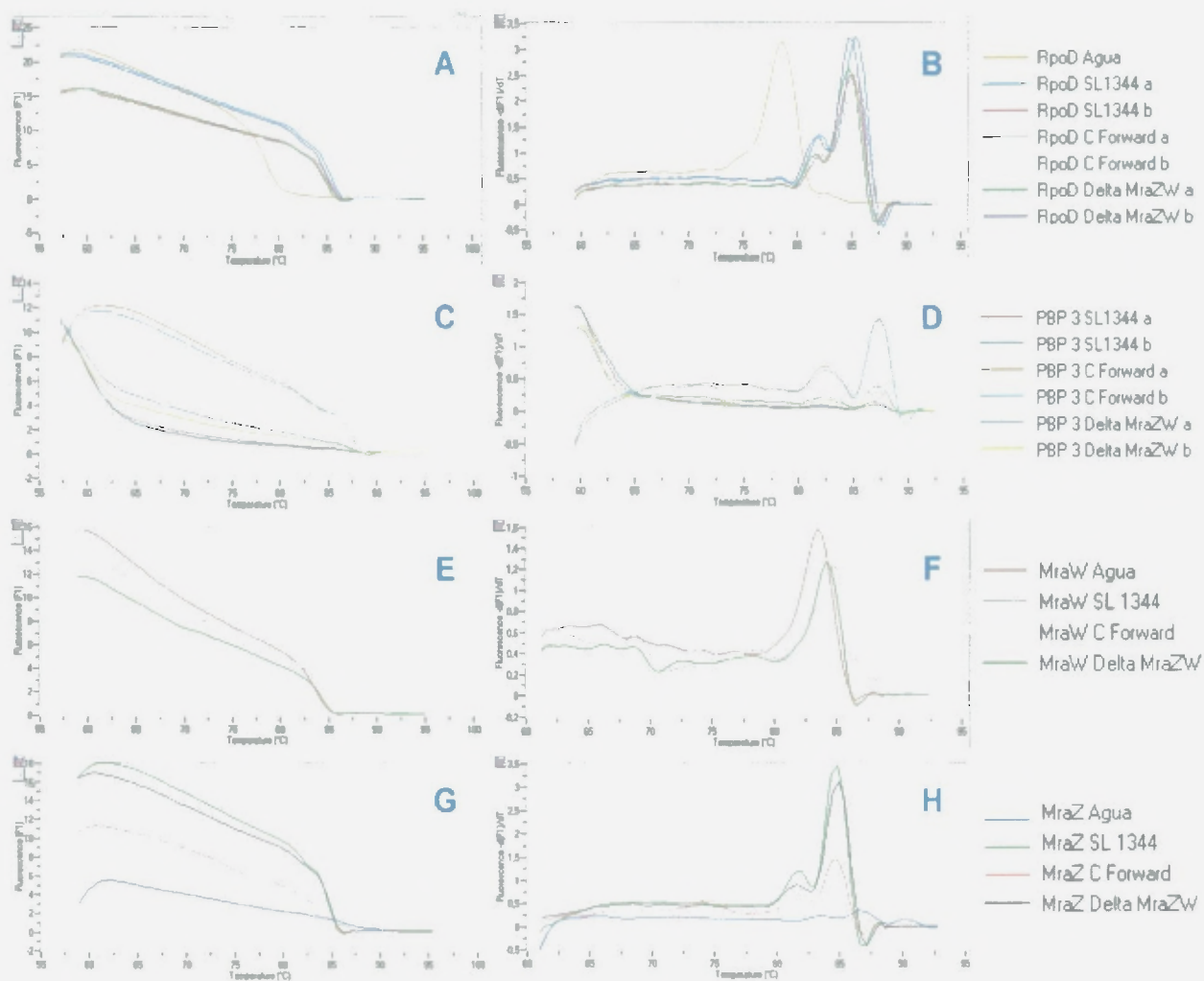


Figura N° 39. Resultados de la RT-PCR cuantitativa

SL1344 (A), mutante resistente a cloranfenicol (B) y mutante $\Delta mraZW$ (C). Se muestran los valores obtenidos para los genes codificantes para PBP3, MraW, MraZ y el gen reportero *rpoD*.

11. Análisis por HPLC del peptidoglicano

Los mutantes sometidos a los ensayos antes descritos, fueron crecidos a 37°C en medio LB o LB cloranfenicol 20µg/ml, según el mutante empleado y se recolectaron en fase logarítmica de crecimiento para obtener el PG, el cual fue analizado por HPLC a fin de determinar la existencia de alguna variación en la composición de los muropéptidos.

En la siguiente figura se muestra una comparación de los cromatogramas obtenidos. Puede apreciarse que no hay una variación sustancial en la composición de los muropéptidos que conforman el peptidoglicano de las estirpes analizadas, ya que todos los picos analizados mostraron valores iguales o menores del 1/1000.

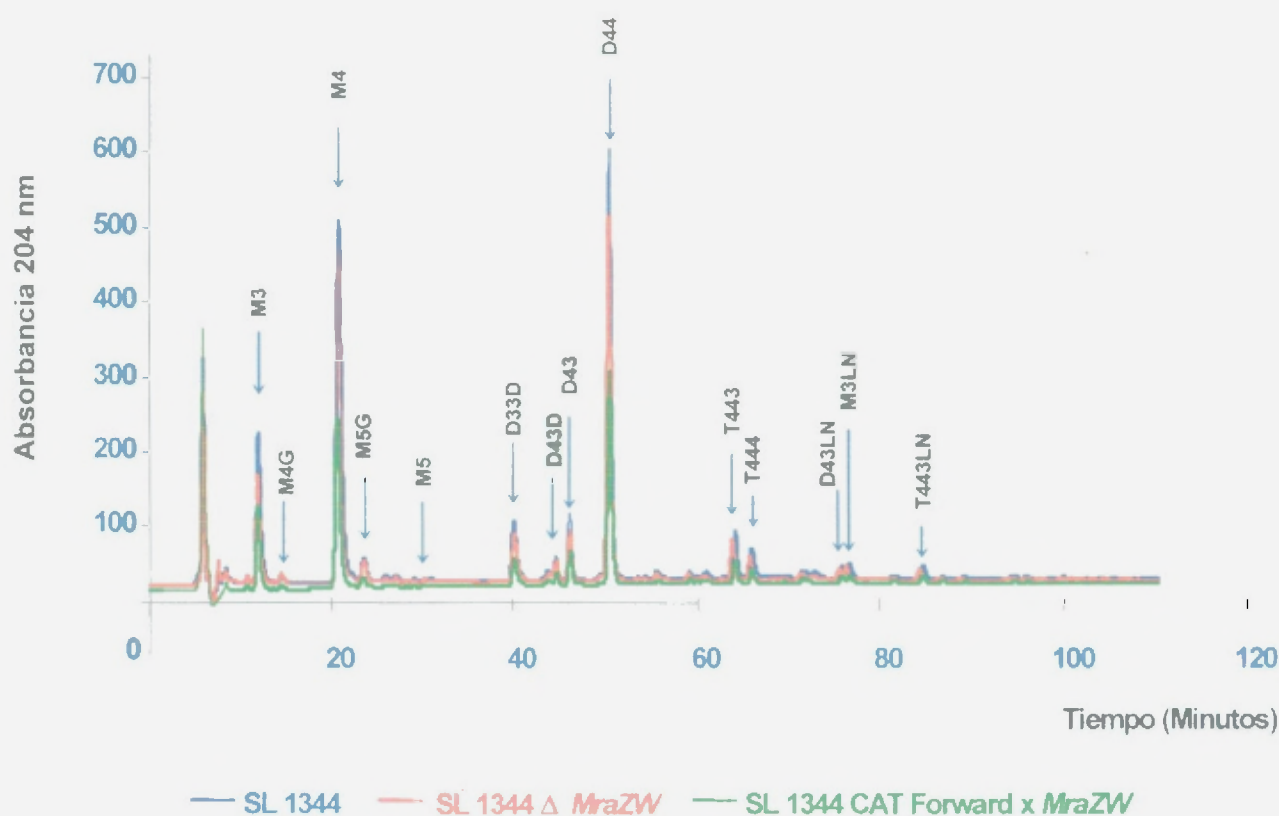


Figura N° 40. Análisis por HPLC de la composición de muropéptidos del peptidoglicano
Se analizaron las estirpes: SL1344, Mutante SL1344CF y mutante SL1344 $\Delta mraZW$. Las estirpes fueron crecidas en medio LB e incubadas a 37°C y colectadas en fase logarítmica de crecimiento.

12. Clonaje, expresión, purificación y determinación de la actividad enzimática de *MraW*.

Se clono *mraW* de *Lactococcus lactis* MG-8 y SL1344, de manera similar a lo descrito para PBP4B, en pET28b (+) y se transformo en BL21(DE3) para su sobreexpresión en LB a 37°C y colectando a D.O_{600 nm}: 1. (ver apartado 8 de materiales y métodos).

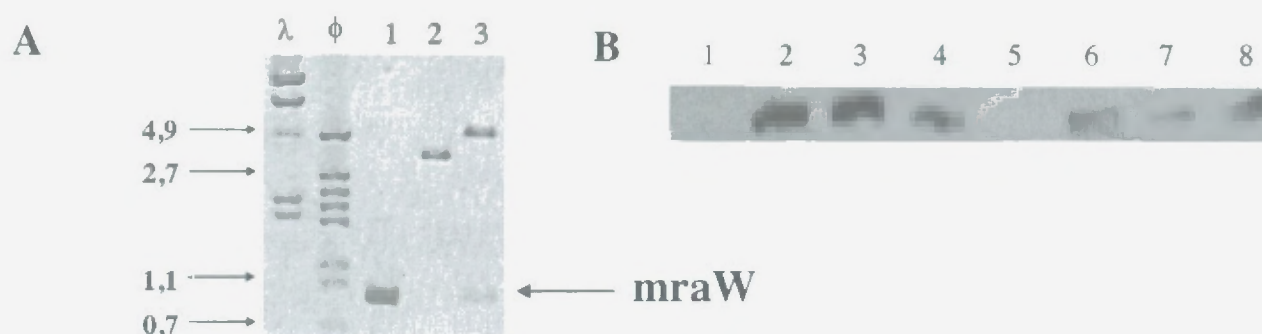


Figura N° 41. Clonaje de *mraW* en pET28b.

En (A) línea 1, gen *mraW* con sitios de corte para *Nde*I/*Hind*III flanqueantes, línea 2, plasmido pET28b-*mraW* y línea 3, verificación por restricción con *Nde*I/*Hind*III. En (B) inmunodetección con anticuerpos anti histidina, (1) no inducción, (2) inducción por 0,25 (3) 0,5 y (4) 1 mM IPTG en extracto citoplasmático. 5, 6, 7 y 8 son los correspondientes a extracto de membrana.

La proteína fue purificada usando columnas de Ni-NTA, dializada, liofilizada y conservada a -20°C. Se realizaron ensayos de croos-linking con rayos U.V para determinar su capacidad de fijar SAM-H³ en tiempo de exposición de 0 a 20 minutos. Los resultados observados en la figura N° 42, muestra que *MraW* purificada no fue capaz de realizar la fijación con SAM.

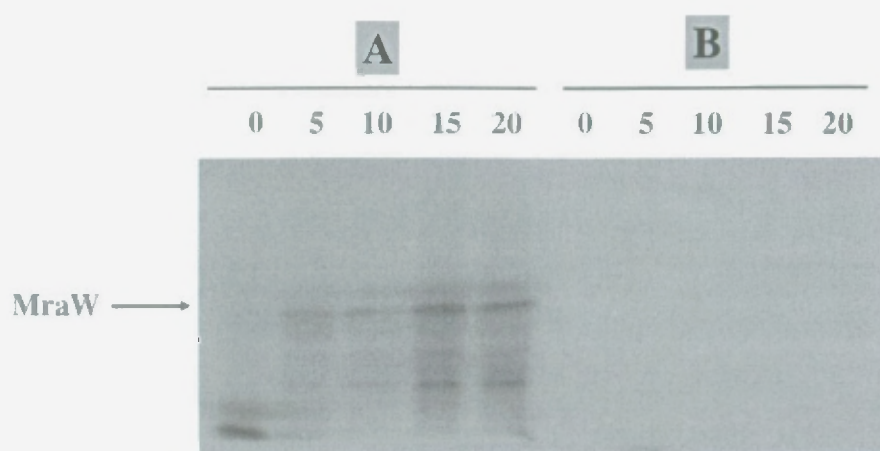


Figura N° 42. Ensayo de fijación de SAM-H³ por *MraW*.

Tras un mes de exposición a -70°C, se revelo la autoradiografía, observándose resultados positivos solo cuando se usaron extractos totales de *mraW* (A) al contrario de cuando se uso *MraW* purificada (B).

Se realizó el ensayo para determinar actividad metiltransferasa, mostrando los resultados que *MraW* purificada no exhibe una actividad apreciable, en comparación con los resultados observados cuando se emplea extractos de membrana enriquecidos en *MraW*. (Ver figura N° 43)

Posiblemente la proteína no presente una conformación estable que le permita ser funcionalmente activa, debido posiblemente a los procesos de sobreexpresión o purificación a la que fue sometida.

1 2 3 4 5 6



Figura N° 43. Ensayo de actividad metiltransferasa por *MraW*. Autoradiografía revelada tras un mes de exposición a -70°C , que muestra *MraW* Purificada + (1) membranas CS-109, (2) membranas enriquecidas en PBP3 y (3) membranas enriquecidas en *MraW*. 4, 5 y 6 son los correspondientes empleando extracto Citoplasmático *MraW*.

13. Sustitución y eliminación de *gidB*

Los resultados obtenidos en la estrategia de sustituir e inactivar los genes *mraZ* y *mraW* en SL1344, nos permitieron determinar la no esencialidad de estos genes en el proceso de división bacteriana y en la biosíntesis del peptidoglicano, por esta razón y teniendo un conocimiento mas aproximado de la función de *mraW*, se decidió realizar la sustitución e inactivación genética del gen *gidB* (glucose-inhibited division protein B, el cual presenta una actividad putativa similar a *mraW* (probable metiltransferasa dependiente de S-Adenosil Metionina (SAM), específico para sustrato esterol y/o lípido)) en un contexto genético en el cual se encuentre inactivado los genes *mraZ* y *mraW*, a fin de determinar la esencialidad de la función metiltransferasa en los procesos biológicos objetos de nuestra atención.

Para seleccionar el cebador a usarse en la amplificación por PCR del gen de resistencia al antibiótico que sustituirá a *gidB*, se verifico la orientación de la expresión de este gen en el genoma de SL1344. Como se puede apreciar en la figura N° 44, la orientación de los genes presentan la misma dirección, por ello se empleo el vector pKD13, que confiere resistencia a kanamicina en orientación acorde a la dirección de expresión observada.

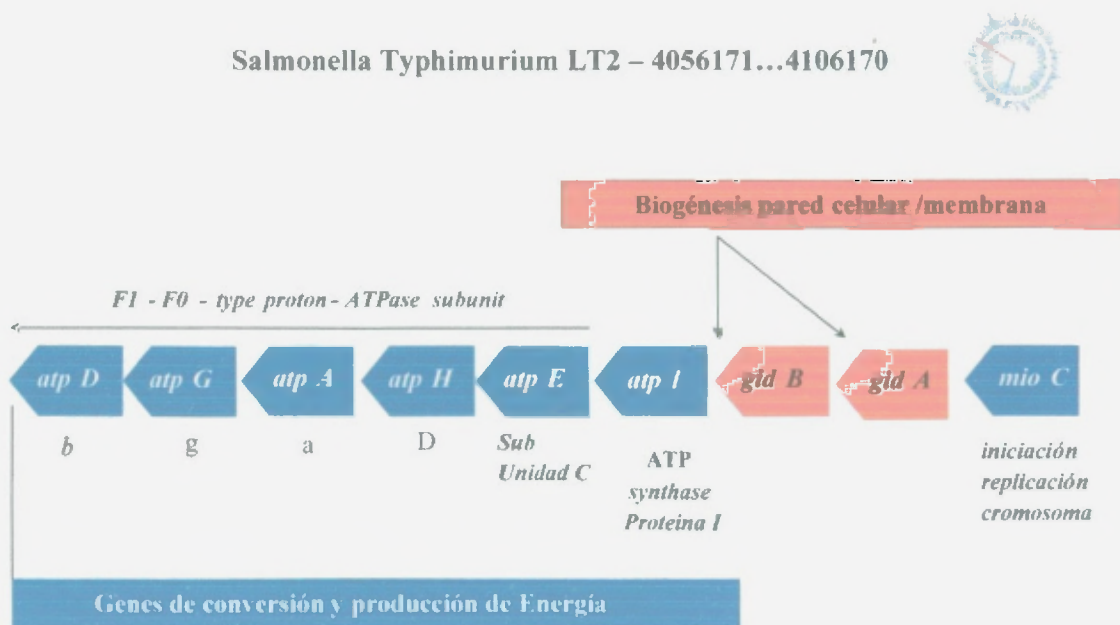


Figura N° 44. Representación esquemática del ordenamiento de los genes adyacentes a *gidB*. Se pueden apreciar los genes involucrados en la conversión y producción de energía, así como el gen de iniciación de la replicación cromosomal, los cuales no participan de manera directa en los procesos biológicos de división celular y biosíntesis del peptidoglicano.

Dado que el gen de resistencia a kanamicina presenta un promotor propio, servirá para evaluar si el efecto de la sustitución de *gidB*, afecta la correcta expresión de los genes adyacentes. De manera similar a los ensayos anteriores de sustitución e inactivación genética, se realizó la verificación de los mutantes generados por el proceso, empleándose para ello parejas de cebadores diseñadas específicamente. En la siguiente figura, se muestra mas en detalle la verificación de los mutantes obtenidos

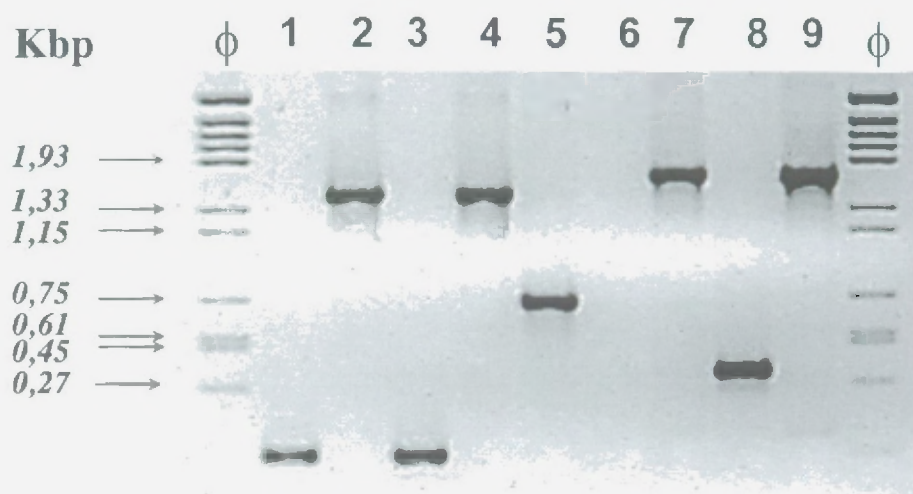


Figura N° 45. Verificación del correcto reemplazo e inactivación del gen *gidB* en SL1344.

Se usaron cebadores de verificación para *gidB*: ForA/RevC como se muestran en las líneas (1) SL1344 Δ *gidB*, (2) SL1344KR::*gidB*, (3) SL1344 Δ *mraZW* Δ *gidB*, (4) SL1344 Δ *mraZW* KR::*gidB*, (5) SL1344, (6) Control negativo. A fin de determinar que los triples mutantes (Δ *mraZW* Δ *gidB*) no habían sufrido alteraciones en los genes *mraZW* se usaron cebadores de verificación ForA/RevD para los genes *mraZ* y *mraW* como se muestran en (7) SL1344 Δ *mraZW* KR::*gidB*, (8) SL1344 Δ *mraZW* Δ *gidB* y (9) SL1344.

Una vez verificados los mutantes, se realizó una curva de crecimiento en medio LB (SL1344 y SL1344 Δ *mraZW* Δ *gidB*) y LB kanamicina 30 μ g/ml (SL1344 Δ *mraZKR*::*gidB*) a 37°C, observándose que la velocidad de crecimiento de los mutantes no difería mucho entre si, salvo en el caso de los transformados por el vector pCP20 que presentaban una ligera reducción en la velocidad de crecimiento (Ver figura N° 46). Es importante señalar que el mismo efecto se apreció en los ensayos anteriores cuando se intentaba eliminar el gen de resistencia al antibiótico transformando los mutantes con pCP20, pero que este efecto remitía al incrementarse la temperatura de cultivo, eliminándose este vector debido a su termosensibilidad.

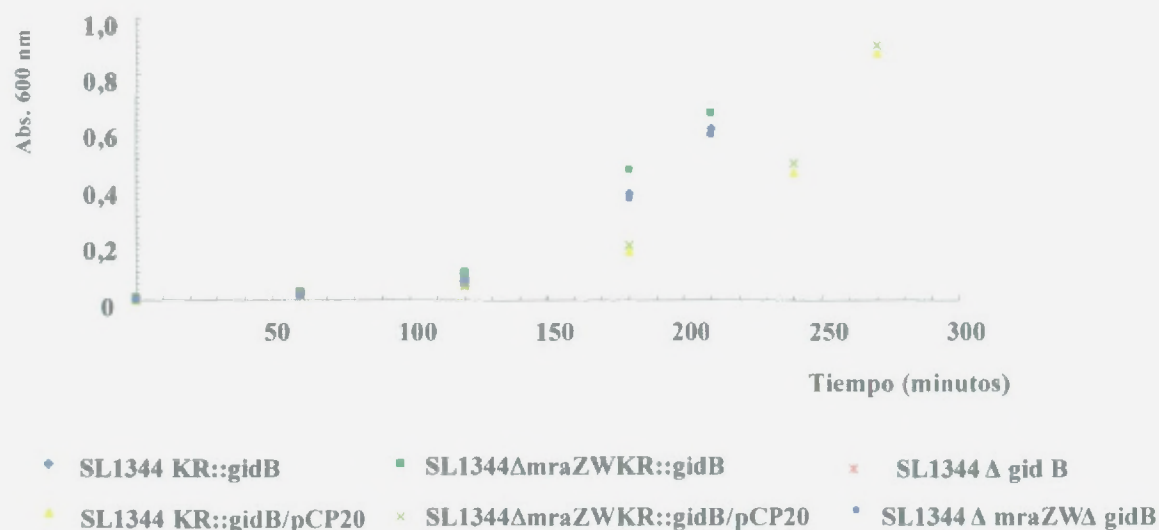


Figura N° 46. Curva de crecimiento para mutantes del reemplazo e inactivación de *gidB* en SL1344. El resultado más llamativo se refiere al efecto producido en los mutantes transformados con el vector pCP20.

Se extrajo el PG y se analizó por HPLC la composición de los muropéptidos. La siguiente figura muestra la comparación de los cromatogramas del PG de los mutantes obtenidos.

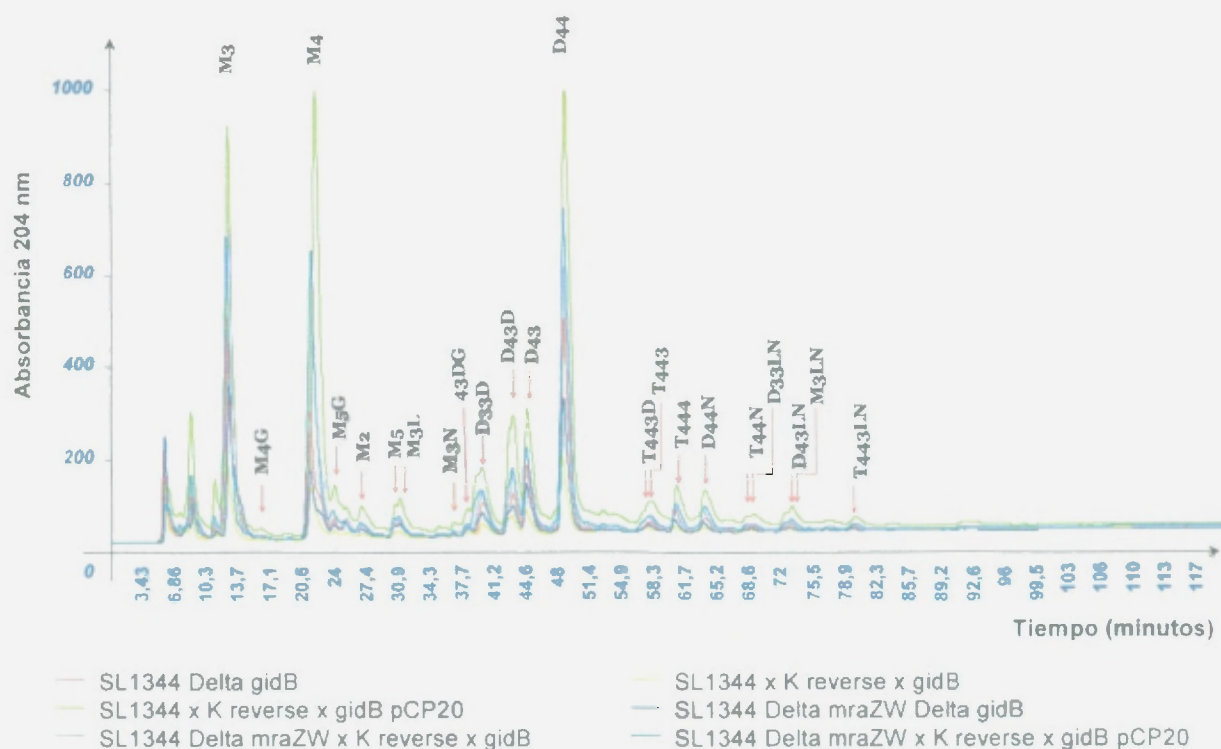


Figura N° 47. Comparación de los cromatogramas obtenidos tras la purificación y análisis por HPLC del PG. Las condiciones de crecimiento y cultivo son las señaladas en la figura anterior.

Se realizó una observación a nivel microscópico del crecimiento de los mutantes (ver figura N° 48), a fin de determinar alteraciones en la morfología que pudieran ser debidas a la mutación generada. Se puede apreciar similitud a nivel morfológico entre los mutantes, salvo en el caso del mutante SL1344 Δ *mraZWKR::gidB*. Esta alteración remitió según avanzaba el tiempo de incubación, apreciándose formas muy semejantes al mutante parental del cual procede.

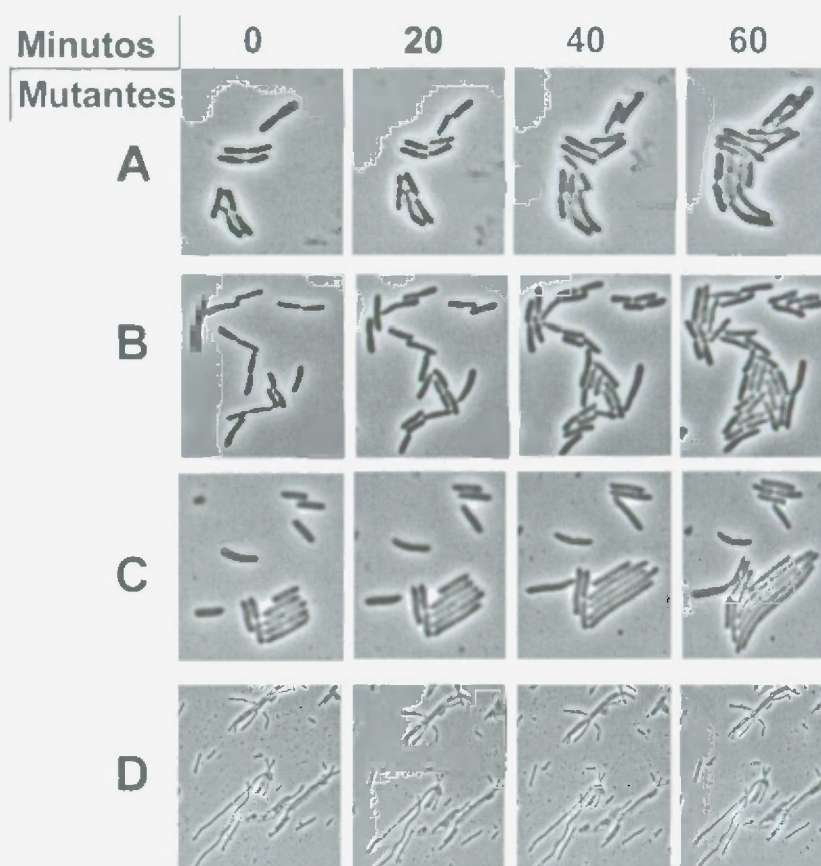


Figura N° 48. Visualización microscópica por FRET de los mutantes derivados de la inactivación del gen *gidB*. (A) SL1344 Δ *gidB*, (B) SL1344*KR::gidB*, (C) SL1344 Δ *mraZW* Δ *gidB* y (D) SL1344 Δ *mraZWKR::gidB*. Los mutantes fueron crecidos en LB o LB kanamicina 30 μ g/ml según corresponda a 37 °C.

14. Sustitución y eliminación de *mraW* en SL1344/pBAD33-*mraW*.

Se clono el gen *mraW* en el vector pBAD33 y se transformaron bacterias competentes SL1344 y se seleccionaron en LB cloranfenicol 20 µg/ml y se crecieron siempre en presencia de arabinosa a fin de garantizar una copia del gen. Se ensayaron diferentes concentraciones de glucosa a fin de determinar cual es la apropiada para lograr la represión total de la expresión del gen en pBAD33 (Ver figura N° 49).

La estrategia de sustitución y eliminación genética de *mraW* es la misma empleada con los genes *pbp4b*, *mraZ* y *mraW*.

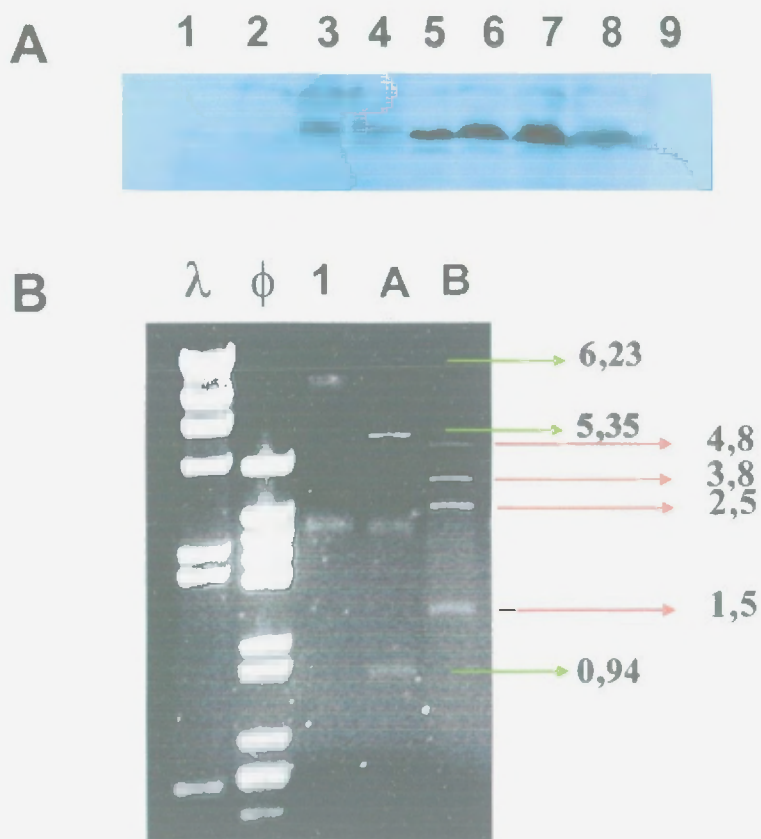


Figura N° 49. Expresión y represión de *mraW* en pBAD33 y transformación en SL1344/ pKD46.

(A) Western-Blot, líneas 1 al 4, porcentajes de Glucosa en los cuales se crecieron los cultivos (1) 0,5, (2) 0,25, (3) 0,12 y (4) 0,06. Líneas del 5 al 9, porcentajes de arabinosa (5) 1, (6) 0,5, (7) 0,25, (8) 0,12 y (9) 0,06. (B) verificación de la transformación por pBAD33-*mraW* y pKD46 en SL1344. Valores esperados: (1) SL1344/pBAD33-*mraW*/pKD46, (A) Digestión por XbaI/HindIII, sitios de corte solo en pBAD33/*mraW* nos dará el tamaño correspondiente a *mraW* (0,94 Kb) y pBAD33 (5,35 Kb) y como no corta en pKD46 se podrá apreciar el tamaño sin digerir (6,23 Kb). (B) Digestión x EcoRI, corta pKD46 generando dos bandas de 4,82 y 1,509 Kb y pBAD33/*mraW* generando dos bandas de 3,8 y 2,5 Kb.

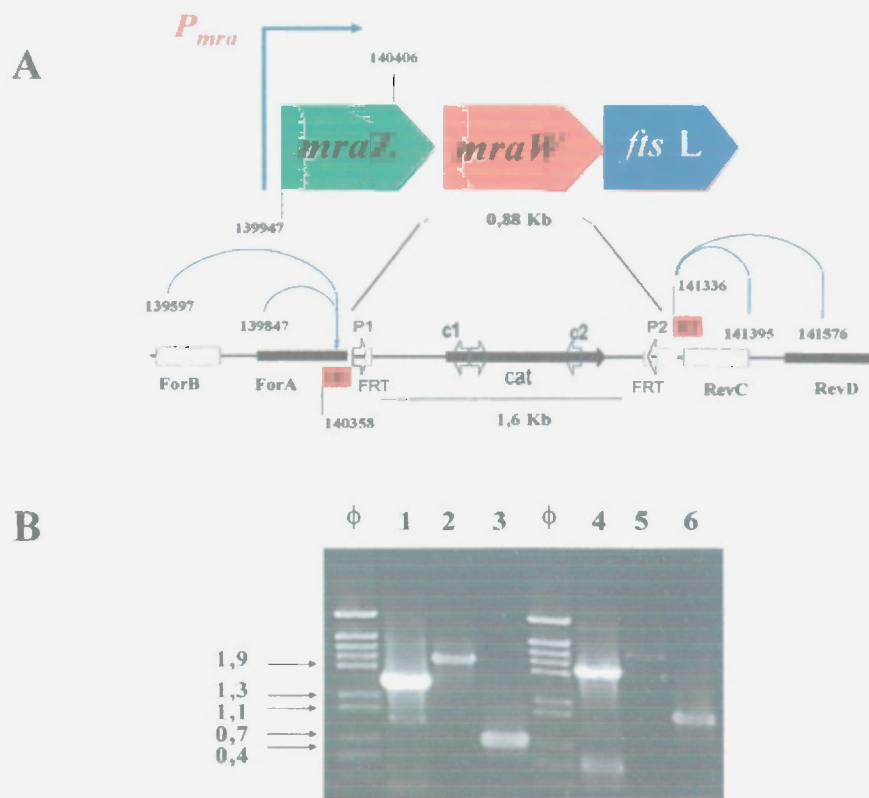


Figura N° 50. Verificación de la sustitución y eliminación de *mraW*.

(A) esquema de la estrategia empleada, se indican las posiciones en el genoma de los cebadores usados. (B) Se usaron los cebadores de verificación ForA/RevC para (1) SL1344, (2) SL1344/pBAD33-*mraW*CF y (3) SL1344/pBAD33-*mraW* Δ *mraW* y ForB/RevD para (4) SL1344, (5) SL1344/pBAD33-*mraW*CF y (6) SL1344/pBAD33-*mraW* Δ *mraW*.



Figura N° 51. Western-Blot para analizar la expresión y represión de *mraW* en pBAD33 en LB y M9.

(A). (1)(5)(9)(13) SL1344. (2)(6)(10)(14) SL1344/pBAD33-*mraW*. (3)(7)(11)(15) SL1344/pBAD33-*mraW* x CF (4)(8)(12)(16) SL1344/pBAD33-*mraW* Δ *mraW*. Los carriles 1 al 4 corresponden al crecimiento a 37°C en LB suplementado con L-Arabinosa 1%. Los carriles 5 al 8 corresponden al crecimiento a 37°C en LB suplementado con D-(+)-Glucosa 1%. (B) Los carriles 9 al 12 corresponden al crecimiento a 37°C en M9 suplementado con L-Arabinosa 1%. Los carriles 13 al 16 corresponden al crecimiento a 37°C en M9 suplementado con D-(+)-Glucosa 1%.

Se realizó la determinación del efecto de la pérdida de *mraW* en el mutante SL1344/pBAD33-*mraW* $\Delta mraW$, para ello se creció durante 18 horas un pre inoculo en LB cloranfenicol. Durante el periodo de tiempo ensayado no se aprecia crecimiento, pero en los ensayos realizados en cultivos tanto en LB como en M9 suplementado con cloranfenicol 20 ug/ml si se observa crecimiento luego de incubación O.N a 37°C. (Ver figura N° 52).

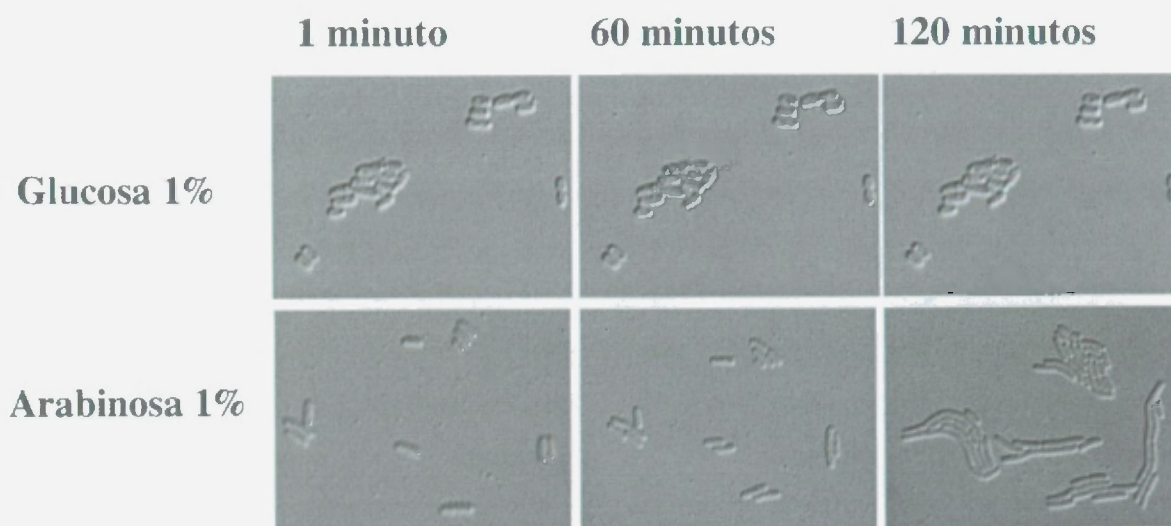


Figura N° 52. Efecto de la expresión y represión de *mraW* en pBAD33.
Crecimiento a 37 °C en LB cloranfenicol 20 ug/ml + Glucosa 1% del mutante SL1344 $\Delta mraZ$ /pBAD33-*mraW*

DISCUSIÓN

1. El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de la implementación de la Ley de Protección de Datos Personales en el sector empresarial de Chile, considerando los aspectos legales, técnicos y organizacionales involucrados.

Este trabajo de investigación centra su atención principalmente en dos procesos biológicos, ellos son la biosíntesis del peptidoglicano y la división bacteriana. La importancia de estos procesos radica en que son de carácter esencial para la viabilidad de la célula bacteriana y los componentes o las etapas de su síntesis no ocurren o no tienen contrapartida en el ser humano.

Esto nos brinda una alternativa real en la búsqueda de nuevas dianas antimicrobianas que nos permitan hacer frente al fenómeno de adquisición de resistencia por parte de los microorganismos patógenos, algunos de los cuales se creían controlados o erradicados, pero que han desarrollado de manera alarmante, resistencia a los antibióticos, incluso a los de última generación.

Respecto a los componentes de la biosíntesis del PG, nuestro grupo de trabajo ha identificado, clonado, expresado, purificado y caracterizado una nueva PBP en *Escherichia coli*., esta nueva proteína ha sido capaz de unir Bocillin-FL confirmando esto, que es una PBP. Se le ha denominado PBP4B por su homología con PBP4, además presenta homología con AmpH, de manera que se sospechaba que podría presentar actividad DD-carboxipeptidasa y/o β -lactamasa.

Uno de los primeros objetivos planteados, fue realizar la sustitución y eliminación de *pbp4b* en diversas estirpes de *E. coli* (BW25113 y RP1) y determinar los efectos a nivel de morfogénesis, que produciría (de haberlos) la pérdida de la actividad enzimática de PBP4B en un contexto genético silvestre. Además interesaba saber, si en el caso de influir en la morfogénesis de *E. coli*, podría generar alteraciones en la capacidad de invasión y proliferación intracelular en nuestro organismo modelo de patogenicidad, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344.

Realizamos una estrategia de sustitución y eliminación genética basada en el proceso de recombinación homóloga descrito por Datsenko⁸¹, generándose mutantes en BW25113, RP1 y SL1344 que presentaban el gen *pbp4b* sustituido por genes de resistencia a kanamicina o cloranfenicol en orientación forward o reverse y mutantes $\Delta pbp4b$. Todos los mutantes obtenidos (de sustitución y eliminación) fueron viables, indicándonos en primer lugar que PBP4B no es esencial y la caracterización a nivel microscópico nos demostró que no existían aberraciones morfológicas.

Esto quizás sea debido a que existen otras PBPs presentes en la bacteria, que realizan la misma función en diferente grado (PBP4, PBP5, que es la DD-carboxipeptidasa mayoritaria, PBP6, PBP6B, AmpH, AmpC), estas puedan estar realizando una compensación genética que subsane la pérdida de PBP4B, además debido a que el numero de copias de PBP4B en la célula no es muy elevado, podría resultar menos apreciable el efecto de la pérdida.

Los mutantes SL1344KF y SL1344 $\Delta pbp4b$, se emplearon para realizar ensayos de infección en líneas celulares eucarióticas permisivas (HeLa) y no permisivas (NRK y NIH/3T3), obteniéndose valores para su capacidad de invasión e índice de proliferación intracelular similares a los observados en SL1344, salvo en el caso del mutante SL1344KF, ello debido quizás a que el cassette del gen resistencia presenta su propio promotor, el cual alteraría la correcta expresión de los genes downstream en el contexto genético de *pbp4b*. Dado que los resultados obtenidos en líneas celulares cultivadas in vitro, podrían diferir de lo observado en el huésped, se realizaron ensayos en el modelo animal de infección por vía oral, resultando ser el mutante SL1344KF menos virulento en comparación con SL1344 $\Delta pbp4b$ y SL1344.

Se ha postulado que una actividad DD-carboxipeptidasa es esencial para la formación del precursor del lípido II-tripéptido, que es empleado como sustrato específico para PBP3. Por esta razón consideramos importante desarrollar una estrategia que nos permita determinar en un contexto genético desprovisto de actividad D-carboxipeptidasa, el carácter esencial o no de esta nueva PBP4B, empleando para ello un mutante en el cual se hallan eliminadas todas las PBPs con actividades DD-carboxipeptidasa conocidas (CS-802-2) ¹⁹. En este contexto genético se realizó la sustitución y eliminación del gen codificante para *pbp4b*, mediante la técnica de Datsenko ⁸¹, generándose mutantes de sustitución (DV-900KF::*pbp4b* y DV-900KR::*pbp4b*) y eliminación (DV-900) viables.

La caracterización de DV-900, nos indico que el fenotipo, crecimiento y morfología de este mutante es idéntico al observado en CS-802-2, mutante del cual procede, demostrando con esto que la actividad de PBP4B en el entorno genético ensayada, no es esencial para la división o elongación celular.

Cabe mencionar que el mutante DV-900KF::*pbp4b*, presento una fase lag muy extendida y lisis celular durante la fase inicial del crecimiento, posiblemente debido a un posible efecto polar, ocasionado por el promotor del gen de resistencia a kanamicina alterando la expresión de los 4 genes (de función desconocida) presentes downstream a PBP4B, que se expresan en sentido opuesto a la dirección de la transcripción del gen de resistencia, pudiendo llegar incluso a afectar al gen *amiA* (involucrado en división bacteriana) en la misma dirección de transcripción.

Al determinar que PBP4B no es esencial para la división o elongación de la célula bacteriana, se realizó la determinación de su actividad enzimática. Para ello se empleó PBP4B purificada y dos tipos de sustratos: el tripéptido sintético N α , N ϵ -Diacetyl-Lys-Dala-D-ala y el disacárido-pentapéptido M5 (NAcMur-NAcGlu-L-ala-D-glu-m-dap-D-ala-D-ala) demostrándose que PBP4B presentaba una actividad DD-carboxipeptidasa muy baja.

Si bien PBP4B presenta una baja actividad DD-carboxipeptidasa, podría exhibir una actividad β -lactamasa considerablemente mayor, dado que se encuentra ubicada en el COG1680, donde se encuentran proteínas con actividad DD-carboxipeptidasa y β -lactamasa. Por esta razón se realizó el clonaje en el vector pK18, usando como control de actividad el gen *ampC*, para determinar la posible actividad β -lactamasa empleando Nitrocefín, siendo los resultados negativos para PBP4B, confirmando que no presenta dicha actividad.

En resumen, PBP4B, es realmente una **Penicillin-Binding Protein**, con una baja actividad DD-carboxipeptidasa, no presenta actividad β -lactamasa, y no es esencial para los procesos de biosíntesis del peptidoglicano en *E. coli*, y no parece afectar de manera significativa la capacidad de invasión y proliferación intracelular de SL1344.

Esto nos lleva a plantearnos cuestiones, tales como ¿que otra proteína (o proteínas) esta (n) llevando a cabo esta reacción?, ¿se tratarían de alguna de las PBPs que han quedado sin inactivar dado su carácter esencial o letal? y si eso fuera así, quizás indicaría que las actividades enzimáticas involucradas en la biosíntesis del PG (tan redundantes, ya que cuesta entender por que un sistema biológico tiene varias copias de genes que codifican para proteínas que cumplen la misma función, haciéndonos pensar que se trata de una actividad de carácter tan esencial que la maquinaria enzimática de la bacteria se asegura de no quedarse nunca sin una copia capaz de subsanar cualquier pérdida que pueda ocurrir por antibióticos, mutaciones, etc.

De hecho una única PBP cumple todas las funciones de la biosíntesis del peptidoglicano en un mutante MRSA, aunque en este caso se trata de una bacteria cocoide Gram positiva, donde una misma proteína con actividades transglicosilasa y transpeptidasa auxiliadas por los homólogos de FtsW y RodA podría ser suficiente.

Alternativamente, una actividad DD-carboxipeptidasa sería esencial y en este caso el lípido II-tripéptido debe de ser aportado de nueva síntesis.

Durante la fase citoplasmática de biosíntesis del PG, se añaden de manera secuencial a NAcMur, los aminoácidos L-ala-D-glu-mDap-D-ala-D-ala, por acción de ligasas específicas MurC, MurD, MurE, y Mur F, esta unidad disacárida-pentapéptica es ligada por acción de MraY al bactoprenol, generándose el lípido I, y luego por acción de MurG se liga NAcGlu formándose el lípido II, que será traslocado al espacio periplasmático para que por acción de las PBPs continúen la fase de elongación y maduración del PG. Pudiéndose utilizar también la unidad disacárida-tripéptido, para ser translocada.

Contando con una construcción genética que sobre expresa la proteína MurF, bajo el control de un promotor fuerte (P_{TRC}) inducible por IPTG, se pretendió determinar la esencialidad del lípido II-unidad disacárida-tripéptido, en el proceso de biosíntesis de PG. El efecto de la sobreproducción de MurF genera un incremento en la unidad disacárida-pentapéptido y por el contrario una reducción o eliminación de la unidad disacárida-tripéptido. La construcción genética pMLD116K-MurF, se utilizó para transformar CS-109 y DV-900 y determinar si el efecto varía en función del entorno genético en el cual se desarrolle.

Los resultados mostraron transformantes viables. El crecimiento de estos, fue realizado en LB y en M9 suplementados con kanamicina 30 $\mu\text{g/ml}$ a 37°C, y se analizó los niveles de expresión de MurF y la composición de muropéptidos por HPLC.

Los transformantes CS-109/pMLD116K-MurF y DV-900/pMLD116K-MurF en condiciones de no inducción, mostraron valores de 600 y 39 veces más actividad específica MurF, respectivamente al ser comparados con sus estirpes parentales. En condiciones de inducción los valores de actividad específica MurF, fueron más del doble en el caso de CS-109/pMLD116K-MurF y de 10 veces en el caso de DV-900/pMLD116K-MurF.

Esto demuestra que aun en condiciones de no inducción, la construcción pMLD116K-MurF no es capaz de regular la expresión de la proteína, aun incluso cuando se empleó medio Mínimo M9 con glucosa, ocurriendo un escape continuo de MurF que altera totalmente la maquinaria enzimática responsable de la biosíntesis de PG, no siendo las condiciones de ensayo las más propicias para determinar el correcto efecto de la sobre expresión, lo que si queda claro, es que aun a niveles bajos del lípido II-disacárido-tripéptido, la bacteria es capaz de ser viable.

Por esta razón, se ensayaran estrategias que permitirán un control mas estricto de la expresión de MurF (clonaje en pK18 o pBAD33), de manera que no se genere proteína en condiciones de no inducción y poner analizar a nivel de composición de muropéptidos cuando ocurre la reducción en los niveles o ausencia de unidad disacárido-tripéptido en la biosíntesis del PG.

La división celular involucra la partición del citoplasma, en un proceso cuantitativa y espacialmente regulado. Muchos de los genes involucrados en el proceso de división celular en bacterias Gram negativas (*E. coli* y SL1344) se encuentran localizados en el minutos 2 del cromosoma en el cluster *dcw*, cuya importancia radica en que contiene 16 genes, de los cuales 6 genes *fts* (*ftsL*, *ftsI*, *ftsW*, *ftsQ*, *ftsA* y *ftsZ*) intervienen en la división celular, además de 7 genes involucrados en la biosíntesis de PG (genes *murC*, *D*, *E*, *F*, *G*, *mraY* y *ddl*) y el gen *envA* (*lpxC*) involucrado en la biosíntesis del lipopolisacárido, de los cuales al menos los 9 primeros genes se hallan bajo el control del promotor P_{mra} .

En *E. coli*, la regulación de la expresión del cluster *dcw* es muy compleja. Dada la ausencia de terminadores de la transcripción, el cluster *dcw* podría funcionar como una única unidad transcripcional. De manera similar, la organización transcripcional del extremo distal es compleja, marcada por la existencia de al menos 7 promotores, localizados dentro de las regiones codificantes para los genes *ftsA*, *ftsQ* y *ddlA*.

Por esta razón intentamos determinar cual seria el efecto de sustituir y eliminar los dos genes presentes al inicio del cluster: *mraZ* y *mraW*, generando un acortamiento en el cluster y una variación en la correcta expresión de los genes. Este acercamiento ubicaría al gen *ftsL* (PBP3) componente esencial de la división celular, mas cerca del efecto del promotor P_{mra} , y podría incluso afectar el nivel de expresión de los genes distales como *ftsZ*. Por esta razón se analizaron a nivel de RT-PCR, los niveles de transcripción de los genes codificantes para FtsW, FtsZ, PBP3, no observándose una diferencia importante en los valores obtenidos, indicándonos que en las condiciones ensayadas, el efecto del acortamiento del cluster por eliminación de los genes *mraZ* y *mraW* no altera el proceso de división celular ni los genes involucrados en la biosíntesis del peptidoglicano.

De manera similar a lo ensayado en PBP4B, se pretendía determinar si estos genes eran esenciales en el proceso de división celular o en la biosíntesis del PG, pero los resultados obtenidos (mutantes de sustitución y de eliminación viables), pudiendo demostrar el carácter no esencial de estos genes o la generación de procesos de compensación genética que permiten la viabilidad de los mutantes.

Se continuó con la caracterización de los mutantes obtenidos, a fin de determinar si la composición de los muropéptidos que conforman el PG estaba alterada, y a nivel morfológico evaluar algún efecto en la capacidad de división. Se demostró que no había variación en la composición de muropéptidos ni células con morfología aberrante.

Así mismo, se determinó por ensayos con líneas celulares eucarióticas y modelo en ratón, que esta mutación no alteraba la capacidad de invasión ni el índice de proliferación intracelular de SL1344.

Dado que se desconoce la función de *mraZ* y *mraW* pero sabemos que *mraW* se encuentra altamente conservada y que exhibe una actividad metiltransferasa dependiente de S-Adenosyl-Metionina sobre sustratos localizados sobre membrana (posiblemente PBP3) y que una deficiencia en S-Adenosil Metionina sintetasa interrumpe el ensamblaje del anillo septal en *E. coli*, se clono, expreso y purifico *MraW* a fin de determinar su actividad enzimática.

En primer lugar se evaluó la capacidad de fijar SAM, para ello usamos SAM marcado con tritio y dos fuentes de *MraW*, la proteína purificada por columnas de Níquel y extractos de membranas enriquecidas en *MraW*, mostrándonos solo capacidad de fijación el extracto de membrana. Esto posiblemente se deba a que la proteína purificada no presenta una conformación estable apropiada debido a los pasos previos de purificación, diálisis y liofilización al que fue sometido.

De igual manera, se realizaron ensayos para determinar la actividad metiltransferasa de *MraW*, enfrentando la proteína purificada y extractos de membrana enriquecidos en *MraW*, con extractos de membranas de CS-109, membranas sobreexpresando *MraW* y PBP3. Mostrando señal en aquellas reacciones en las que estaba sobreexpresada PBP3, con una banda de tamaño aproximado de 60Kd, correspondiente a PBP3. Postulándose que PBP3 podría ser el sustrato de metilación de *MraW*, por esta razón se realizara un ensayo bidimensional a fin de determinar el sustrato de metilación.

Dado que la sustitución y eliminación de *MraW*, no es esencial, postulamos que quizás estuviera ocurriendo un proceso de compensación genética, mediado por otro gen (o genes) que compartiera (n) una actividad putativa similar, como es el caso del gen *gidB*, el cual presenta una actividad metiltransferasa dependiente de SAM.

Se realizó la sustitución y eliminación del gen *gidB* en SL1344 y en el entorno genético del mutante SL1344 $\Delta mraZW$, obteniéndose mutantes viables que carecían tanto de *gidB* como de *mraZ* y *mraW*, demostrando que o bien nuestra aproximación no era la correcta y verdaderamente la actividad de *MraW* no es esencial o que de manera similar a lo que ocurre con los procesos biológicos claves, existen mas de una alternativa de compensar genéticamente la pérdida de una actividad enzimática.

A nivel morfológico, se apreciaron formas alargadas o filamentosas en el mutante de sustitución SL1344 Δ *mraZW* KR::*gidB*, pero estas formas no se apreciaron cuando se genera el mutante de eliminación SL1344 Δ *mraZW* Δ *gidB*. Esto posiblemente debido al efecto del promotor del gen de resistencia a kanamicina.

Por esta razón, se planteó una estrategia para determinar de manera apropiada, que la actividad de *MraW* es esencial, clonando el gen *mraW* de SL1344, en el vector pBAD33, el cual presenta el promotor P_{BAD} del operon *araBAD* y el regulador positivo y negativo *araC*, de manera que si se realiza la sustitución y eliminación de *mraW* en presencia continua de L-arabinosa, siempre existirá una copia extracromosomal del gen, evitando de esta manera la aparición del fenómeno de compensación, luego al crecer los mutantes de sustitución y eliminación en glucosa, se inhibiría la expresión del gen. Los mutantes fueron capaces de crecer en presencia de glucosa, confirmando la no esencialidad de *mraW*.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha analizado el comportamiento de la demanda de energía eléctrica en el sector residencial de la ciudad de Madrid, durante el periodo comprendido entre 1995 y 2005. Se ha observado que la demanda de energía eléctrica en este sector ha crecido de manera constante, lo que se debe a la creciente demanda de energía eléctrica por parte de los hogares. Este crecimiento se ha reflejado en un aumento de la capacidad instalada de la red eléctrica, lo que ha permitido satisfacer la demanda creciente sin afectar a la calidad del servicio. Sin embargo, el crecimiento de la demanda de energía eléctrica en el sector residencial también ha generado un aumento de los costes de la energía eléctrica, lo que ha afectado a los hogares. Por lo tanto, es necesario implementar medidas para reducir el consumo de energía eléctrica en el sector residencial, lo que puede lograrse mediante la promoción de la eficiencia energética y la utilización de energías renovables.

El análisis de los resultados obtenidos y comentados durante el desarrollo de nuestra investigación, nos permiten concluir lo siguiente:

PBP4B, es una Penicillin-Binding Protein, no esencial en el proceso de biosíntesis del peptidoglicano, no presenta actividad β -lactamasa, tampoco altera de manera sustancial la capacidad de invasión y proliferación intracelular en SL1344 y presenta una baja actividad DD-carboxipeptidasa.

La presencia del sustrato lípido II-tripéptido es esencial en el proceso de biosíntesis de peptidoglicano, ya que la inducción de la síntesis de MurF, con la consiguiente sobreexpresión de lípido II-pentapéptido, en un fondo genético sin DD-carboxipeptidasas, hace elevar los niveles de muropéptidos tri y tetera, así como la actividad L-D-transpeptidasa.

Los genes *mraZ* y *mraW* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL1344 no son esenciales en el proceso de división celular y no alteran la composición de muropéptidos en el peptidoglicano. La sustitución y/o pérdida de estos genes no afectan grandemente la capacidad de invasión ni el índice de proliferación intracelular en líneas celulares eucarióticas permisivas y no permisivas ni en modelo de experimentación animal.

Los niveles de transcripción de los genes *ftsI*, *ftsZ*, y *ftsW* del cluster *dcw* no se ven alterados al producirse un acortamiento en el cluster variando el control de la expresión del promotor P_{MRA} .

MraW, es una metil transferasa dependiente de S-Adenosyl-Metionina, con capacidad de unión a -Adenosyl-Metionina y con un probable sustrato de metilación en PBP3.

El clonaje de *mraW* bajo el control de un promotor dependiente de arabinosa, la obtención del mutante de delección cromosómica en presencia de arabinosa y el crecimiento del mutante en condiciones de eliminación de la expresión de MraW por crecimiento en glucosa, han permitido concluir que la aparente no esencialidad de esta proteína para el proceso de división celular en *Salmonella*, parece ser debido a una rápida adquisición de mutaciones compensatorias.

La obtención del doble mutante SL1344, $\Delta mraW$, $\Delta gidB$, permite concluir que la posible mutación compensatoria, no ha ocurrido en el gen *gidB*, candidato con posible actividad metil transferasa dependiente de SAM.

De manea conjunta, los resultados expuestos en el presente trabajo de investigación, permiten mostrar que si bien los genes empleados como blanco de sustitución y eliminación genética en *E. coli* y *SL1344*, no presentan el carácter esencial que permite emplearlos como factibles dianas antibacterianas y en el diseño de nuevos antibióticos, el conocimiento generado de su función y actividad enzimática, servirá de apoyo a futuras estrategias que enfoquen los otros genes involucrados en los procesos de biosíntesis del peptidoglicano y división celular.

BIBLIOGRAFIA

1. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-2019-ncov](#)

1. Amyes S.G. 2003. Resistance to beta-lactams – the permutations. *J. Chemother.* Vol. 15(6):525-35.
2. Ayala J. & De Pedro M. 1994. Genética molecular de la pared microbiana. Nuevos blancos susceptibles de inhibición. In avances en ingeniería genética. Capítulo 8 – Centro Superior de Investigaciones Científicas de Madrid.
3. Barnickel, G.; Labischinski, H.; Bradaczek, H. & Giesbrecht, P. 1979. Conformational energy calculation on the peptide part of murein. *Eur. J. Biochem.* 95:157-165.
4. Barnickel, G.; Neumann, D.; Labischinski, H.; Bradaczek, H. & Giesbrecht, P. 1983. Computer aided molecular modelling of the three dimensional structure of bacterial peptidoglycan. *The Target of Penicillin* Ed. Hakenbeck, R.; Höltje, J.V., and Labischinsky, H. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
5. Begg K.J., Spratt B.G. & Donachie W.D. 1986. Interaction between membrane proteins PBP3 and RodA is required for normal cell shape and division in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol.167. N°3. pp. 1004-1008.
6. Begg K.J., Takasuga A., Edwards D., Spratt B., Adachi H., Ohta T., Matsuzawa H & Donachie W. The balance between different peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia coli* cells will elongate or divide. *Journal of Bacteriology*. Vol.172. N° 12. pp. 6697-6703.
7. Bishop R.E. & Weiner J.H. 1993. Complementation of growth defect in an *ampC* deletion mutant of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 114:349-354
8. Boyle D.S. & Donachie W. 1998. *MraY* is an essential gene for cell growth in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 180. N° 23. p. 6429-6432.
9. Braun, V. 1975. Covalent bound lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*. 415:335-377.
10. Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R. & Swaminathan B. 2000. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38, N° 7 : 2465-2467.

11. Brown N.F., Coombes B.K., Valdez Y., Coburn B.A & Finlay B.B. 2005. Salmonella Pathogenicity Island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. PLOS Pathogens. Vol.1: 3: 252-258.
12. Carrion M, Gomez MJ, Merchante-Schubert R, Dongarra S, Ayala JA. 1999. *mraW*, an essential gene at the *dcw* cluster of *Escherichia coli* codes for a cytoplasmic protein with methyltransferase activity. Biochimie 81: 879-888
13. Chiang S.L., Mekalanos J.J & Holden D.W. 1999. In vivo genetic analysis of bacterial virulence. Annu. Rev. Microbiol. 53:129-54.
14. Colling, D. & Kachar B. 1998. Principles and application of fluorescent Microscopy. In Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc 14.10.1 – 14.10.11.
15. Cox M.M. 1983. The FLP protein of the yeast 2- μ m plasmid: Expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.80. pp. 4223-4227.
16. Dandekar T, Snel B, Huynen M, Bork P. 1988. Conservation of gene order: a fingerprint of protein that physically interact. Trends Biochem. Sci. 23: 324-328.
17. De Jonge, B.L.M.; Wientjes, F.B.; Jurida, I.; Driehuis, F.; Wouters, J.T.M. & Naninga, N. 1989. Peptidoglycan synthesis during the cell cycle of *Escherichia coli*: composition and mode of insertion. J. Bacteriology. 171:5783-5794.
18. De la Fuente A., Palacios P. & Vicente M. 2001. Transcription of the *Escherichia coli* *dcw* cluster: Evidence for distal upstream transcripts being involved in the expression of the downstream *ftsZ* gene. Biochimie 83: 109-115.
19. Denome S.A., Elf P.K., Henderson T.A., Nelson D.E and Young K.D. 1999. Journal of Bacteriology. *Escherichia coli* Mutants Lacking All Possible Combinations of Eight Penicillin Binding Proteins: Viability, Characteristics, and Implications for Peptidoglycan Synthesis. Vol. 181, No. 13. p. 3981-3993

20. Dewar S. & Dorazi R. 2000. Control of division gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 187. 1-7.
21. Dramsi. S. & Cossart P. 1998. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14:137-166.
22. Finlay B.B. 2000. Fluorescent and confocal microscopy reveals host-microbe interactions. ASM News. Vol.55, N° 10. pp. 601-608.
23. Finlay B.B & Falkow S. 1988. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. Biochimie. 70(8):1089-99.
24. Finlay B.B & Ruschkowski S. 1991. Cytoesqueletal rearrangements accompanying *Salmonella* intro epithelial cells. Journal of Cell Science. 99:283-296.
25. Francis F., Ramírez-Arcos S., Salimnia H., Victor C. & Dillon J.R. 2000. Organization and transcription of the division cell wall (dcw) cluster in *Neisseria gonorrhoeae*. Gene. 251: 141-151
26. Giannela R.A., Washington O. 1973. Invasion of HeLa cells by *Salmonella typhimurium*: A model for study of invasiveness of *Salmonella*. The Journal of Infectious diseases. Vol. 128. N°1: 69-75
27. Glauner, B. & Schwarz, U. 1983. The analysis of murein composition with high pressure liquid chromatography. The Target of Penicillin. Ed. Hakenbecck, R.; Höltje, J.V., and Labischinsky, H. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
28. Glauner B, Holtje J-V., and Schwarz Uli. 1998. The Composition of the Murein of *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 263, No. 21. pp. 10088-10096.
29. Goffin C. & Guisen J-M. 1998. Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An enigmatic family of orthologs and paralogs. Microbiology and Molecular Biology reviews. Vol.62 N° 4. pp.1079-1093.

30. Hapfelmeier S. et al. 2005. The Salmonella pathogenicity island (SPI)-2 and SPI-1 type III secretion systems allow Salmonella serovar typhimurium to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms. *The Journal of Immunology*.
31. Hapfelmeier S. & Hardt W-D. 2005. A mouse model for S. typhimurium-induced enterocolitis. *Trends in Microbiology*. Vol. 13. N° 13. pp.497-503.
32. Hara H., Yasuda S., Horiuchi K & Park J. 1997. A promoter for the first nine genes of the Escherichia coli mra cluster of cell division and cell envelope biosynthesis genes, including ftsI and ftsW. *Journal of Bacteriology*. Vol.179. N°18. pp. 5802-5811.
33. Harris f., Branderburg K., Seydel U. & Phoenix D. 2002. Investigation into the mechanisms used by the C-terminal anchors of Escherichia coli penicillin-binding proteins 4, 5, 6 and 6b for membrane interaction. *Eur. J. Biochem*. 269, 5821-5829.
34. Heijenoort J.V. 2001. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep*. 18:503-519.
35. Heijenoort J. 1996. Murein synthesis. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*, ASM Press: Washington, DC.
36. Höltje J-V. & Heidrich C. 2001. Enzimology of elongation and constriction of the murein sacculus of Escherichia coli. *Biochimie* 83: 103-108.
37. Höltje J-V. 1998. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. Vol. 62, No. 1. p. 181-203.
38. Jacoby G.A. & Munoz-Price L.S. 2005. Mechanism of disease: The new β -Lactamases. *The New England Journal of Medicine*. 352;4.pp.380-391.
39. Jones B.D. 1997. Host response to pathogenic Salmonella infection. *Genes & Development* 11: 679-687
40. Koch A. L., 2003. Bacterial Wall as target for attack: past, present, and future research. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol.16; N° 4, p 673-687.

41. Koch A.L. 1981. Evolution of antibiotic resistance gene function. *Microbiological Reviews*. Vol.45. N°2. pp.355-378.
42. Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*. 1: 190-206.
43. Liu G., Begg K., Geddes A. & Donachie W.D. 2001. Transcription of essential cell division genes is linked to chromosome replication in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 40(4): 909-916.
44. Lutkenhaus J. & Mukherjee A. 1996. Cell Division. In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E. (2ª Ed) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, Vol. 1. American Society for microbiology. Washington, D.C.
45. Margolin W. 2000. Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 531-548.
46. Margolin W. 1998. A green light for the bacterial cytoskeleton. *Trends in Microbiology*. Vol.6. N°6. p.233-238.
47. Martínez-Moya. M., M. A. de Pedro, H. Schwarz and F. García-del Portillo. 1998. Inhibition of *Salmonella* intracellular proliferation by non-phagocytic eukaryotic cells. *Research in microbiology*. 149:309-18.
48. Massova I. & Mobashery S. 1998. Kinship and diversification of bacterial Penicillin-Binding Proteins and β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol.42. N°1. pp.1-17
49. Mengin-Lecreulx D., Ayala J., Bouhss A., Van Heijenoort J., Parquet C. & Hara H. 1998. Contribution of the P_{mra} promoter to expression of genes in the *Escherichia coli* mra cluster of cell envelope biosynthesis and cell division genes. *Journal of bacteriology*. Vol.180., N° 17., p.4406-4412.
50. Merlin C., McAteer & Master M. 2002. Tools for characterization of *Escherichia coli* genes of unknown function. *Journal of bacteriology*. Vol. 184, N°16. p.4573-4581.

51. Millar, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
52. Mingorance J., Tamares J. & Vicente M. 2004. Genomic channelling in bacteria cell division. *Journal of Molecular recognition*; 17: 481-487.
53. Mukherjee A. & Donachie W. 1990. Differential translation of cell division proteins. *Journal of bacteriology*. Vol.172. N°10. p.6106-6111
54. Nanninga N. 1998. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. Vol.62; N°1; p. 110-129.
55. Nelson D.E. & Young K.D. 2001. Contributions of PBP5 and DD-carboxypeptidase penicillin-binding protein to maintenance of cell shape in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol.183. N° 10. pp.3055-3064.
56. Nelson. D.E. & Young K.D. 2000. Penicillin-Binding Proteins 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 182. N°6. pp.1714-1721.
57. Nilsen T., Ghosh A.S., Goldberg M.B. & Young K.D. 2004. Branching sites and morphological abnormalities behave as ectopic poles in shape-defective *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 52(4). 1045-1054.
58. Park J.T. 1996. The Murein Saccus. In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E. (2ª Ed) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1. American Society for microbiology. Washington, D.C.
59. Perkins H. *et al.* 1976. Exocellular DD-Carboxipeptidase - Transpeptidase from *Streptomyces*. *Methods in Enzymology*, 45:610-636.
60. Pisabarro, A. G.; de Pedro M.A. & Vázquez, D. 1985. Structural modifications in the peptidoglycan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. *Journal of Bacteriology*. 161:238-242.

61. Poole K. 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* Vol.61 (17):2200-2223.
62. Popham D.L. & Young K.D. 2003. Role of Penicillin-Binding Proteins in bacterial cell morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology*.6:594-599.
63. Quintela J.C., de Pedro M.A., Zöllner P., Allmaier G. & Garcia-del Portillo F. 1997. Peptidoglycan structure of *Salmonella typhimurium* growing within cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology*. 23(4), 693-704.
64. Rasia R.M & Vila A.J. 2003. Mechanistic study of the hydrolysis of nitrocefin mediated by *B. cereus* metallo- β -lactamase. *Arkivoc* (x) 507-516.
65. Reed LJ, Muench HA (1938) A simple method of estimating. Fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 27:493. 31.
66. Sánchez M.M. & Cardona N.M. 2000. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. *Infectio*: 22-29.
67. Segura I, Casadesús J & Ramos –Morales Francisco. 2004. Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *Journal of Microbiological Methods*. 56: 83-91
68. Sharma, R. C., and R. T. Schimke. 1996. Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques* 20:42-44
69. Siegfried Hapfelmeier & Wolf-Dietrich Hardt. 2005. A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends in Microbiology*. Vol. 13 N°10, 397-503.
70. Silver L.L. 2003. Novel Inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *Current Opinion in Microbiology*. 6:431-438.
71. Spratt B.G. & Cromie K.D. 1998. Penicillin-Binding Proteins of Gram-Negative Bacteria. *Reviews of Infectious Diseases*. Vol.10. N° 4.pp. 699-711

72. Strominger, J.L. 1983. Penicillin-binding proteins as a target of the lethal effects of β -lactam antibiotics, pp. 349-357. In: Hakenbecck, R.; Höltje, J.V., and Labischinsky, H. (eds.): The Target of Penicillin. Walter de Gruyter, Berlin-New York.
73. Syed S.K. Kim S. & Paik W.K. 1993. Identification of the S-Adenosyl-L-methionine Binding site of protein-carboxyl-O-methyltransferase using 8-azido-adenosyl-L-metionine. *Biochemistry*. 32, pp. 2242-2247.
74. Takeuchi, A. 1967. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. *Am. J. Pathol.* 50:109-136.
75. Verter, R.W.H.; Naninga, N.; Keck, W. & Schwarz, U. 1978. Arrangement of glycan strands in the sacculus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriology*. 136: 723-729.
76. Vicente M, Gomez MJ, Ayala JA. 1998. Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli* *dcw* cluster. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 317-324
77. Vollmer W. & Höltje J-V. 2001. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Current opinion in Microbiology*. 4:625-633.
78. Wallis T.S. & Galyov E.E. 2000. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritidis. *Molecular Microbiology*. 36(5):997-1005.
79. Walsh C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. Vol.406. pp.775-781.
80. Wang S., Arends R., Weiss D. & Newman E.B. 2005. A deficiency in S-adenosylmethionine synthetase interrupts assembly of the septal ring in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*. 58(3), 791-799.
81. Wanner B, Datsenko K. 2000, One-Step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *PNAS*, 97: 6640-6645.
82. Waxman D.J. & Strominger J.L. 1983. Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics. *Annual Review of Biochemistry*. Vol. 52: 825-869.

83. Weiss D.S. 2004. Bacterial cell division and the septal ring. *Molecular Microbiology*. 54(3): 588-597.
84. Weldhagen G.F. 2004. Integrons and β -Lactamases-a novel perspectiva on resistance. *internacional Journal of Antimicrobial Agents*. Vol. 23. pp.556-562.
85. Young K.D. 2003. Micro Review - Bacterial shape. *Molecular Microbiology*. 49(3): 571-580.
86. Young K.D. 2001. Approaching the physiological functions of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *Biochemie*. 83:99-102.
87. Zhao G., Meier T., Kahl S., Gee K. and Blaszcak L. 1999. BOCILLIN FL, a Sensitive and Commercially Available Reagent for Detection of Penicillin-Binding Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Vol. 43, No. 5, p. 1124-1128.

